

**Neue α -anellierte 1-Benzazepinone und deren
azaanalogue Verbindungen als Multikinase-Inhibitoren:
Synthese und biologische Aktivität**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Anne-Marie Louise Egert-Schmidt

aus Göttingen

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. Conrad Kunick |
| 2. Referent: | Professor Dr. Knut Baumann |
| eingereicht am: | 08.12.2008 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 12.02.2009 |

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Egert, A.-M., Kohfeld, S., Kubbutat, M. H. G., Schächtele, C., Totzke, F., Zaharevitz, D. W. and Kunick, C.: 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-ones: Synthesis and profiling of a new multiple kinase inhibitor type. (Poster) 234th ACS National Meeting, Boston, MA, USA (2007).

Egert, A.-M., Kohfeld, S., Kubbutat, M. H. G., Schächtele, C., Totzke, F., Zaharevitz, D. W. und Kunick, C.: 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one: Neue Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Erlangen (2007).

Egert-Schmidt, A.-M., Preu, L., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G. and Kunick, C.: Pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepine-6,9,11-triones: A new type of biologically active heterocycles. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Bonn (2008).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2005 bis Dezember 2008 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine engagierte Betreuung und Unterstützung sehr herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Knut Baumann

für die Übernahme des Koreferats.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die zentrale Rolle von Proteinkinasen im Zellstoffwechsel | 1 |
| 1.2 Inhibition von Proteinkinasen als Therapieoption | 4 |
| 1.2.1 Inhibition der Rezeptorfunktion von RTKs durch Bindung von Antagonisten | 4 |
| 1.2.2 Inhibition von RTK-Liganden | 6 |
| 1.2.3 Hemmung der Kinaseexpression | 7 |
| 1.2.4 ATP-kompetitive Kinase-Inhibition | 7 |
| 1.2.5 Allosterische und Substrat-kompetitive Kinaseinhibition | 15 |
| 1.3 Der Prozess der Wirkstoffentwicklung | 17 |
| 1.3.1 Die Auswahl eines geeigneten Targets | 17 |
| 1.3.2 Die Erzeugung von Hits, Leitstrukturen und Wirkstoffen | 18 |
| 1.3.3 Fokussierte Bibliotheken zur Leitstruktur-Findung | 21 |
| 2 Ziel der Arbeit | 24 |
| 3 Synthesen | 29 |
| 3.1 Synthese der 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dione und azaanaloger Derivate | 29 |
| 3.1.1 Synthese des 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions | 29 |
| 3.1.2 Synthese des 7,8-Dihydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]azepin-6,9-dions | 30 |
| 3.1.3 Synthese des 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]azepin-2,5-dions | 32 |
| 3.1.4 Synthese des 8-Methoxy-3,4-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions | 34 |
| 3.1.5 Synthese der Enaminoketone | 35 |
| 3.2 Synthese der Anilinopyrimidine | 37 |
| 3.2.1 Synthese der Arylguanidiniumnitrate | 37 |
| 3.2.2 Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 38 |
| 3.2.3 Synthese der Aminoalkoxy-Anilinopyrimidine | 40 |
| 3.2.4 Versuche zur Synthese von Phenol-Mannich-Basen | 43 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2.5 | Versuche zur Synthese von [1,3]Thiazolo[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-5-onen | 44 |
| 3.3 | Synthese der 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3- <i>d</i>][1]benzazepin-5(1 <i>H</i>)-one und azaanaloger Verbindungen | 48 |
| 3.4 | Synthese der 7,12-Dihydro-5 <i>H</i> -pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6,9,11(10 <i>H</i>)-trione und azaanaloger Derivate | 51 |
| 3.5 | Synthese weiterer <i>d</i> -anellierter 1-Benzazepinone und azaanaloger Verbindungen | 66 |
| 4 | Biologische Aktivität | 71 |
| 4.1 | Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität | 71 |
| 4.2 | Testung der In-vitro-Antitumoraktivität | 71 |
| 4.3 | Biologische Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 72 |
| 4.3.1 | Kinaseinhibitorische Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 72 |
| 4.3.2 | Ergebnisse der zellulären Assays der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 82 |
| 4.3.3 | Antiproliferative Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 86 |
| 4.3.4 | Vorgeschlagener Bindemodus der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 92 |
| 4.3.5 | Patentierbarkeit der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate | 98 |
| 4.4 | Testung der antiproliferativen Aktivität der 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[3,4- <i>d</i>]benzazepin-5(1 <i>H</i>)-one und Azaanaloga | 99 |
| 4.5 | Kinaseinhibitorische Aktivität der 7,12-Dihydro-5 <i>H</i> -pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6,9,11(10 <i>H</i>)-trione und Azaanaloga | 101 |
| 4.6 | Kinaseinhibitorische Aktivität der weiteren <i>d</i> -anellierten 1-Benzazepinone und azaanaloger Verbindungen | 103 |
| 5 | Zusammenfassung | 105 |
| 6 | Summary | 108 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 7 | Experimenteller Teil | 111 |
| 7.1 | Allgemeines | 111 |
| 7.2 | Synthesen und analytische Daten | 115 |
| 7.3 | Biologische Daten | 193 |
| 7.3.1 | Proteinkinase-Assay (ProKinase) | 193 |
| 7.3.2 | In-vitro-Tumorzelllinien-Screening (NCI) | 202 |
| 7.3.3 | Durchführung der molekularen Docking-Studien | 212 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 213 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|---|
| Å | Ångström |
| AAV | Allgemeine Arbeitsvorschrift |
| Abb. | Abbildung |
| ACN | Acetonitril |
| AK | Antikörper |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| Bcr-Abl | <i>breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase</i> |
| ber. | berechnet |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CHCl ₃ -d ₁ | Deuterochloroform |
| CDK | <i>cyclin-dependent kinase</i> |
| cLogP | berechneter Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungs- koeffizienten |
| CML | Chronisch-Myeloische Leukämie |
| δ | Chemische Verschiebung |
| d | Dublett |
| DAD | <i>diode array detector</i> |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DEPT | <i>distorsionless enhancement by polarisation transfer</i> |
| d. h. | das heißt |
| DMA | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMF-DMA | <i>N,N</i> -Dimethylformamid-Dimethylacetal |
| DMSO-d ₆ | Hexadeuterodimethylsulfoxid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| D ₂ O | Deuteriumoxid |
| EI | Elektronenstoß-Ionisation |
| EMA | <i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London</i> |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |

| | |
|------------------------|---|
| eq | <i>equivalent</i> |
| ERK | <i>extracellular signal-regulated kinase-2</i> |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| FAK | <i>focal adhesion kinase</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration, USA</i> |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| gef. | gefunden |
| GI ₅₀ | <i>growth inhibition 50 %</i> |
| GIST | gastrointestinale Stromatumore |
| GSK-3 | Glycogen Synthase Kinase-3 |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasser |
| HMBC | <i>heteronuclear multiple bond correlation</i> |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HRMS | <i>high resolution mass spectrometry</i> |
| HSQC | <i>heteronuclear single quantum coherence</i> |
| HTS | <i>high throughput screening</i> |
| Hz | Hertz |
| IC ₅₀ | <i>inhibitory concentration 50 %</i> |
| IGF-1R | <i>Insulin-like Growth factor-1 receptor</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| INS-R | Insulin-Rezeptor Kinase |
| INTEREST | <i>Iressa NSCLC Trial Evaluating REsponse and Survival against Taxotere</i> |
| IR | Infrarot |
| ISEL | <i>Iressa Survival Evaluation in Lung cancer</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| IVCLSP | <i>in vitro cell line screening project</i> |
| <i>J</i> | Kopplungskonstante |
| K-Ras | <i>Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue</i> |
| λ_{max} | Absorptionsmaxima |
| LC ₅₀ | <i>lethal concentration 50%</i> |
| Lit. | Literatur |

| | |
|-------------------|---|
| log ₁₀ | dekadischer Logarithmus |
| m | Multiplett |
| M | molar |
| MAK | Monoklonaler Antikörper |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MEK | <i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 1</i> |
| MG-MID | <i>meangraph midpoint</i> |
| MHz | Megahertz |
| min | Minute(n) |
| M | Molare Masse |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| m/z | Masse pro Ladungseinheit |
| NBS | <i>N-Bromsuccinimid</i> |
| NCI | <i>National Cancer Institute</i> |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| NOE | <i>nuclear overhauser effect</i> |
| NROT | <i>number of rotatable bonds</i> |
| NSCLC | <i>non-small cell lung cancer</i> |
| PCC | <i>Pearson correlation coefficient</i> |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> |
| PDGFR | <i>platelet derived growth factor receptor</i> |
| PI3K | <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> |
| pIC ₅₀ | dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Wertes |
| PKB | <i>protein kinase B</i> |
| PLK-1 | <i>polo-like kinase 1</i> |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| %ig | prozentig |
| PSA | <i>polar surface area</i> |
| q | Quartett |
| quart. | quartär |
| Raf | <i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog</i> |
| Ras | <i>rat sarcoma virus oncogene</i> |

| | |
|-----------|--|
| RCC | <i>renal cell carcinoma</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor-Tyrosinkinase |
| s | Singulett |
| SRC | <i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i> |
| Schmp. | Schmelzpunkt |
| t | Triplett |
| tert. | tertiär |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TGI | <i>total growth inhibition</i> |
| t_m | Totzeit |
| t_{m+s} | Gesamtretentionszeit |
| TMS | Tetramethylsilan |
| t_s | Nettoretentionszeit |
| UV | Ultra-Violett |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGF-R | <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> |
| W | Watt |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| z. T. | zum Teil |
| °C | Grad Celcius |

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neuartige Proteinkinase-Inhibitoren dargestellt, sowie bekannte Kinaseinhibitoren strukturell modifiziert und dadurch in Bezug auf ihre biologische Aktivität und biophysikalischen Eigenschaften optimiert werden. Im folgenden Kapitel wird zunächst die Funktion von Proteinkinasen beschrieben. Anschließend folgt ein Überblick über verschiedene Klassen von Kinaseinhibitoren und schließlich eine kurze Einführung in das Vorgehen zur Entwicklung dieser Wirkstoffe.

1.1 Die zentrale Rolle von Proteinkinasen im Zellstoffwechsel

Proteinkinasen katalysieren die Übertragung von Phosphatgruppen auf eine Hydroxylgruppe in einem Substratprotein und beeinflussen dadurch dessen Aktivität.¹ Die Phosphorylierung zählt zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen zellulärer Proteine. Proteinkinasen nehmen daher eine Schlüsselfunktion in Signaltransduktions-Prozessen ein, die Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Bewegung und Apoptose eukaryotischer Zellen regulieren. Protein-Phosphorylierung spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Funktion von Immun- und Nervensystem.² Eine fehlerhafte Funktion von Proteinkinasen hat schwerwiegende Auswirkungen auf die Regulation des Zellzyklus und führt häufig zu ernsthaften Stoffwechselstörungen. Diese können sich in Tumorerkrankungen, chronisch-entzündlichen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen oder Diabetes mellitus äußern.^{2, 3}

Proteinkinasen stellen somit vielversprechende Zielmoleküle für pharmakologische Substanzen dar und viele der forschenden Pharmaunternehmen haben die Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren zu einem Schwerpunkt gemacht.⁴

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 518 humane Proteinkinasen identifiziert worden. Das entspricht einem Anteil von etwa 1,7 % am humanen Genom. Damit stellen Proteinkinasen eine der größten enzymatischen Familien in Eukaryonten dar.² Nach ihrer Substratspezifität unterscheidet man Serin-/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen. Letztere lassen sich wiederum in Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen unterteilen.⁵

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) sind Transmembran-Proteine. Sie setzen sich aus einer glykosylierten, extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer einzelnen α -helikalen, hydrophoben Transmembranregion und der stark konservierten intrazellulären Domäne mit tyrosinspezifischer Proteinkinase-Aktivität zusammen. Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch kommt es an den cytoplasmatischen Domänen zu Autophosphorylierungen mehrerer Tyrosin-Reste, d. h. die beiden Teile des Rezeptor-Dimers phosphorylieren sich gegenseitig. Die autophosphorylierten Tyrosinreste dienen als hochaffine Bindungsstellen für verschiedene intrazelluläre Signalproteine der Zelle. Viele dieser Proteine werden nach der Bindung an den Rezeptor selbst an Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert. Auf diese Weise werden Signaltransduktionskaskaden ausgelöst und Reize bis ins Innere der Zelle weitergeleitet.⁶ Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen kommen im Cytoplasma und z. T. auch im Zellkern vor. Sie sind häufig mit anderen Rezeptor-Proteinen ohne eigene Kinasedomäne assoziiert, z. B. Cytokin-, T- oder B-Zell-Rezeptoren.^{7, 8, 9, 10}

Nahezu alle Proteinkinasen (bis auf 40 sog. atypische Kinasen) bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, die vorwiegend aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist, und einer größeren, nahezu vollständig α -helikalen carboxyterminalen Domäne. Die beiden Domänen sind über die sog. Hinge-Region miteinander verbunden. Proteinkinasen zeichnen sich untereinander durch eine sehr homologe katalytische Domäne von ca. 250 bis 300 Aminosäuren aus. Diese Domäne dient dazu, den Phosphatgruppen-Donor, meist Adenosintriphosphat (ATP), als Komplex mit einem zweiwertigen Kation (Magnesium oder Mangan) sowie das zu phosphorylierende Substratprotein in der geeigneten Orientierung zu binden und die endständige γ -Phosphatgruppe von ATP auf Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Hydroxylgruppen des Substrats zu übertragen.

Die eigentliche ATP-Bindetasche der katalytischen Domäne befindet sich zwischen der amino- und carboxyterminalen Domäne. Sie ist hoch konserviert, d. h. die aus 38 Aminosäuren bestehenden ATP-Bindetaschen einzelner Kinasen sind sehr ähnlich.¹ In der ATP-Bindetasche und deren unmittelbarer Nachbarschaft lassen sich fünf verschiedene Bereiche festlegen. Drei davon werden von dem gebundenen ATP selbst ausgefüllt, und zwar die Adenin-Tasche, in der die bereits erwähnte Hinge-Region liegt, die Ribose- und die Phosphat-Tasche.

Der hydrophile Eingangsbereich der ATP-Bindetasche, die als Lösungsmittel-zugewandte Region (*solvent accessible region*) bezeichnet wird, sowie die hydrophoben Taschen im hinteren Teil (*hydrophobic backpockets*) gehen dagegen keine Wechselwirkungen mit ATP ein. Die beiden zuletzt genannten Bereiche weisen die größte Sequenzvariabilität innerhalb der Proteinkinase-Familie auf.^{1, 11} Eine detailliertere Beschreibung des Bindemodus von ATP in der Bindetasche folgt in Kapitel 4.3.4, in dem auch der Bindemodus von Kinaseinhibitoren diskutiert wird, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden.

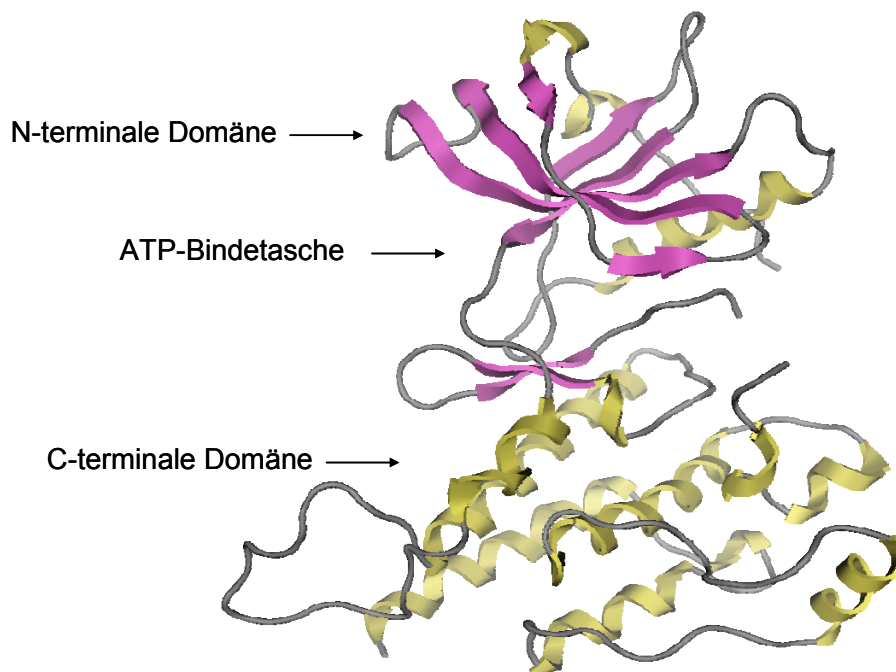


Abbildung 1-1: Struktureller Aufbau der Kinase VEGF-R2

Die Abbildung wurde von Jan Dreher, Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, basierend auf dem pdb-file 1YWN¹² erstellt. Die Visualisierung erfolgte mit MOE Molecular Operating Environment, 2007.09, Chemical Computing Group, Inc.: Montreal, Canada, 2007.

Pfeile stellen β -Faltblattstrukturen dar (violett), α -Helices sind als Bänder dargestellt (gelb).

1.2 Inhibition von Proteinkinasen als Therapieoption

Fehlerhafte Kinasefunktionen können zahlreiche Erkrankungen zur Folge haben, weshalb die Regulierung der Kinaseaktivität eine wichtige therapeutische Option darstellt. Dies äußert sich in zahlreichen zugelassenen Arzneimitteln, die Kinasen auf unterschiedliche Weisen beeinflussen. Der Indikationsschwerpunkt liegt dabei auf malignen Erkrankungen.

Proteinkinasen bieten verschiedene Angriffspunkte. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

1.2.1 Inhibition der Rezeptorfunktion von RTKs durch Bindung von Antagonisten

Binden spezifische Antikörper an die glykosylierte extrazelluläre Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinasen, so wird die Bindung des natürlichen Rezeptor-Liganden verhindert und die Funktion der RTKs dadurch beeinflusst.¹³ Eingesetzt werden dazu monoklonale Antikörper.

Monoklonale Antikörper werden mittels Hybridomtechnik hergestellt, bei der Antikörper-sezernierende B-Zellen aus immunisierten Mäusen mit Zellen einer Myelom-Zelllinie zu hybriden Zellen verschmolzen werden. Diese Hybridomzellen produzieren einen bestimmten Antikörper und zeigen unbegrenztes Wachstum in vitro.¹⁴

Die Verwendung muriner Antikörper ruft im menschlichen Organismus allerdings eine starke Immunantwort hervor, so dass weiter modifizierte monoklonale Antikörper für therapeutische Zwecke entwickelt wurden. Bei chimären Antikörpern besteht der konstante Teil des Immunglobulins (Ig) aus humanen Peptidsequenzen und nur der variable Teil der Antigen-bindenden Fragmente enthält noch Mausprotein (Abb. 1-2). Humanisierte Antikörper weisen nur noch in den hypervariablen Regionen (Komplementaritäts-bestimmenden Regionen) Mausanteile auf und rein humane Antikörper können mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie vollständig ohne Mausanteil hergestellt werden.¹⁵

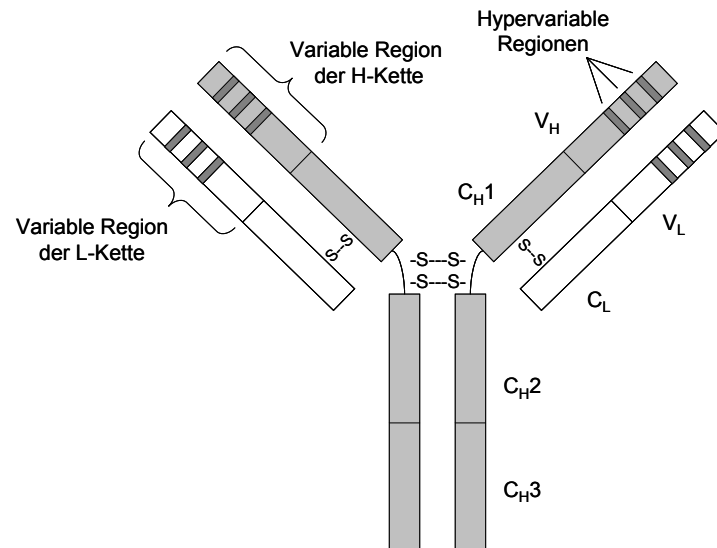


Abbildung 1-2: Schematisierte Darstellung eines IgG-Antikörpers

Die leichte (L: *light chain*) und die schwere Kette (H: *heavy chain*) eines Immunglobulins sind aus verschiedenen konstanten (C) und variablen (V) Regionen aufgebaut. Die Ketten sind über Disulfidbrücken (S---S) miteinander verbunden. Die hypervariablen Regionen beider Ketten bilden zusammen die Antigenbindungsstelle.¹⁴

Trastuzumab (Herceptin[®], Roche) ist ein monoklonaler, rekombinant humanisierter Antikörper, der sich gegen HER2 richtet. HER2 (ErbB2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), verfügt selbst aber nicht über eine Liganden-bindende Domäne. Vielmehr bildet es mit anderen EGF-Rezeptoren ein Heterodimer und stabilisiert so die Bindung von EGF.¹⁶ Als Folge kann die Teilungsrate von Krebszellen und deren Ablösung vom Zellverband beschleunigt werden. Herceptin[®] ist seit 2000 auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zur Monotherapie und in Kombination mit Paclitaxel für die Behandlung von Mammakarzinomen zugelassen. Trastuzumab eignet sich nur für eine Therapie von Brustkrebspatientinnen, deren metastasierende Tumore HER2 überexprimieren. Dies ist bei 25-30 % aller Mammakarzinome der Fall. Die schwerwiegendste Nebenwirkung ist die Kardiotoxizität.¹⁵ Dies wird darauf zurückgeführt, dass HER2 auch am Herzen eine Rolle spielt.¹⁷

2004 wurde in Deutschland mit Cetuximab (Erbix[®], Merck) ein monoklonaler chimärer Antikörper zur Behandlung von metastasierendem Kolon- und Rektumkarzinom zugelassen. Cetuximab bindet selektiv an EGFR (HER1, ErbB1), wodurch die Signalweiterleitung ins Zellinnere unterbrochen und zudem eine Internalisierung des Re-

zeptors induziert wird. EGFR wird bei 60-80 % der kolorektalen Karzinome überexprimiert und fördert unter anderem Angiogenese und Metastasierung des Tumors. Erbitux® wird als Second-line-Therapeutikum eingesetzt, wenn die Standardtherapie, eine Kombination von 5-Fluorouracil und Folinsäure meist zusammen mit Irinotecan oder Oxaliplatin, versagt. Typische Nebenwirkungen bestehen in schweren akneartigen Hautreaktionen, denn durch die EGFR-Blockade wird die Integrität der Haut verringert.^{15, 18}

Panitumumab ist im Gegensatz zu Cetuximab ein rein humaner Antikörper, d. h. er enthält keine murinen Aminosäuresequenzen. Auch Panitumumab (Vectibix®, Amgen) inhibiert EGFR. Eine Therapie ist allerdings nur dann Erfolg versprechend, wenn die Patienten ein nicht mutiertes K-Ras-Gen (Wildtyp) in den EGFR-überexprimierenden Tumorzellen aufweisen. Das K-Ras-Gen kodiert für das GTP-bindende Protein K-Ras (*Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue*), das an der Signaltransduktion beteiligt ist (Ras-Raf-MAPK-Signalweg). K-Ras wird unter anderem von EGFR aktiviert. Eine aktivierende Mutation im K-Ras-Gen hat zur Folge, dass die Signalweiterleitung ständig stattfindet und auch durch eine Inhibition von EGFR nicht verhindert werden kann. Panitumumab ist seit Januar 2008 in Deutschland ebenfalls zur Behandlung des metastasierenden Kolorektalkarzinoms zugelassen. Ob ein tatsächlicher Vorteil gegenüber der Anwendung von Cetuximab etwa durch bessere Verträglichkeit des rein humanen Antikörpers besteht, bleibt abzuwarten.^{18, 19}

1.2.2 Inhibition von RTK-Liganden

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Hoffmann-La Roche) bindet selektiv an den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und verhindert so dessen Bindung an VEGF-Rezeptoren. Dadurch werden die Angiogenese und damit Wachstum und Metastasierung des Tumors gehemmt. Bevacizumab ist seit 2005 als First-line-Therapeutikum in Kombination mit 5-Fluorouracil zur Behandlung bei metastasierendem Kolorektalkarzinom zugelassen.^{13, 15} Seit März 2007 kann Avastin® in Kombination mit Paclitaxel auch zur First-line-Behandlung von metastasierendem Mammakarzinom eingesetzt werden.²⁰

Mit der Entwicklung von VEGF-Trap wird von Regeneron Pharmaceuticals und Sanofi Aventis ein neuartiger Ansatz zur Inhibition von VEGF verfolgt. Es handelt sich dabei um ein lösliches Fusionsprotein, das mit einer Bindungsaffinität im picomolaren Bereich als VEGF-Köder (*decoy protein/receptor*) dient. Es entsteht aus der Kombination von Teilen der extrazellulären VEGF-R1- und -R2-Domäne mit den konstanten Bereichen eines humanen IgG-Antikörpers. Die Bindungsaffinität für zirkulierendes VEGF ist 100- bis 1000fach höher als die monoklonaler Antikörper. Die Wirkung von VEGF-Trap (Aflibercept) gegen verschiedene Krebsarten wird zurzeit in klinischen Studien untersucht.^{13, 21}

In Abbildung 1-5 ist die Wirkung von Bevacizumab und VEGF-Trap dargestellt.

1.2.3 Hemmung der Kinaseexpression

In malignen Zellen können Translokationen zur Bildung von Hybridgenen führen, die chimäre Fusionsproteine exprimieren. So wachsen beispielsweise murine Zellen, die das Bcr-Abl Fusionsprotein exprimieren, unabhängig von Wachstumsfaktoren. Es handelt sich dabei um eine überaktive Tyrosinkinase. Peptide, die an spezifische DNA-Sequenzen im Genom binden, im genannten Beispiel etwa die Sequenz des chimären Bcr-Abl Proteins, können die Transkription des entsprechenden Onkogens blockieren. Auch Ribozyme können gegen Fusionsproteine oder überexprimierte Wachstumsfaktoren in entarteten Zellen eingesetzt werden.

Abschließend sei die Möglichkeit erwähnt, mittels Antisense-Techniken die Expression von Tyrosinkinasen auf der Ebene der Translation zu inhibieren.^{22, 23}

1.2.4 ATP-kompetitive Kinase-Inhibition

Die Möglichkeiten, Proteinkinasen ATP-kompetitiv zu inhibieren, wurde lange Zeit unterschätzt. Die Gründe dafür lagen zum einen in der intrazellulär vorliegenden Zielstruktur, zum anderen in der großen Ähnlichkeit der ATP-Bindetaschen verschiedener Kinasen untereinander und der physiologisch hohen intrazellulären ATP-Konzentration (2-10 mM), welche eine sehr hohe Bindungsaffinität des Inhibitors voraussetzt. Trotz der hohen Homologie unter den Kinasen ist dennoch eine selektive Hemmung möglich. Dies geschieht durch Moleküle, die ein deutlich geringeres Mole-

kulargewicht aufweisen als die bereits vorgestellten Antikörper. Sie werden daher als *small molecule inhibitors* bezeichnet.^{3, 24}

Gefitinib (Iressa[®], AstraZeneca, 1) ist einer der ersten selektiven Inhibitoren der EGFR-Kinase, die auf dem Arzneimittel-Markt zugelassen wurden (Abb. 1-3). Gefitinib zählt zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren, es konkurriert also nicht mit EGF (*epidermal growth factor*), dem eigentlichen EGFR-Liganden, sondern wechselwirkt über einen klar definierten Bindemodus an der ATP-Bindetasche der RTK. Die Bindung des Wachstumsfaktors EGF an EGFR (HER1, ErbB1) führt unter anderem über die Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs zu einer Transkriptionsinduktion, durch die zahlreiche zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und -proliferation initiiert werden. Eine Überexpression von EGFR findet bei zahlreichen Tumorerkrankungen statt, so dass EGFR-Inhibitoren in einem breiten therapeutischen Feld eingesetzt werden können. Gefitinib ist in zahlreichen Ländern, unter anderem Japan, den USA und Kanada zur Second-line-Therapie bei fortgeschritten rezidivierendem oder metastasierendem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) zugelassen. Die Wirkung gegen andere Krebsarten, wie Brust-, Ovarial- oder Leberkrebs wird derzeit in klinischen Studien geprüft. Nach eher enttäuschenden Ergebnissen der ISEL-Studie (*Iressa Survival Evaluation in Lung cancer*), nach der unter Iressa[®]-Therapie keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu Placebo festgestellt wurde, hat AstraZeneca 2005 den Zulassungsantrag bei der Europäischen Zulassungsbehörde (*European Medicines Agency*, EMEA) zurückgezogen.²⁵ Bei der INTEREST-Studie (*Iressa NSCLC Trial Evaluating REsponse and Survival against Taxotere*) mit 1466 Lungenkrebspatienten hat sich Gefitinib jedoch als ähnlich wirksam erwiesen wie eine Behandlung mit Docetaxel. Daraufhin wurde die Zulassung für Europa erneut beantragt. Sie wird in Deutschland für Mitte 2009 erwartet.^{26, 27} Nicht zufrieden stellende Ansprechraten bei einer Iressa[®]-Behandlung sind vermutlich auf Mutationen im EGFR-Gen zurückzuführen.⁴ Erlotinib (Tarceva[®], Genentech, OSI Pharmaceuticals, Hoffmann-La Roche, 2) gehört wie Gefitinib zur Strukturklasse der Phenylaminochinazoline (Abb. 1-3). Es inhibiert EGFR ebenfalls selektiv und ist seit 2005 in Deutschland zur Behandlung von NSCLC zugelassen, wenn mindestens eine vorausgegangene Chemotherapie versagt hat.²⁵

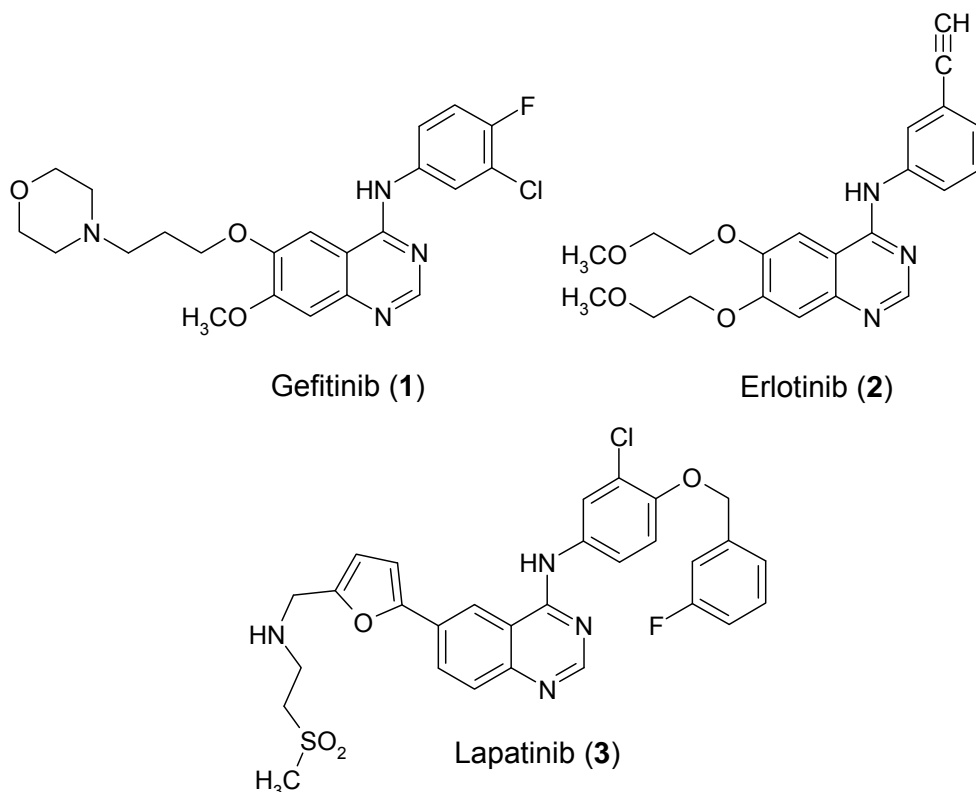


Abbildung 1-3: Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen mit Phenylaminochinazolin-Grundgerüst

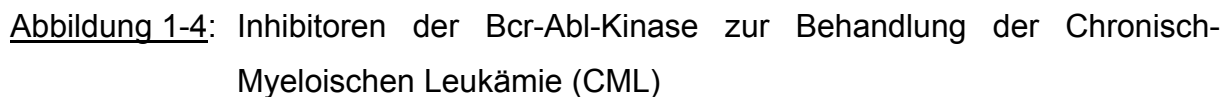
Eine duale Inhibition von EGFR und HER2 zeigt Lapatinib (Tykerb[®], GlaxoSmithKline, **3**), das 2007 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zur Second-line-Therapie fortgeschrittener und metastasierender Mammakarzinome zugelassen wurde, sofern eine Überexpression von HER2 nachweisbar ist (Abb. 1-3).²⁵ Die Wirkung von Lapatinib wurde in Kombination mit Capecitabin in einer Phase-III-Studie an 392 HER2-positiven Patientinnen getestet, die unter progredientem oder metastasierendem Brustkrebs litten und bereits Anthrazykline, Taxane und Trastuzumab erhalten hatten. Die mittlere Zeit bis zur Tumorprogression hatte sich durch die Kombinationsbehandlung mit Lapatinib und Capecitabin von 19,7 Wochen unter Capecitabin-Monotherapie auf 36,9 Wochen nahezu verdoppelt. Die Studie deutet zudem einen Vorteil von Lapatinib gegenüber Trastuzumab an, da die Inzidenz von Hirnmetastasen deutlich verringert war. Dies wird darauf zurückgeführt, dass der *small molecule inhibitor* Lapatinib im Gegensatz zum Antikörper die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann.²⁸

Zur Strukturklasse der 2-Phenylaminopyrimidine gehört Imatinib (Glivec[®], Novartis, **4**), der bisher erfolgreichste Kinaseinhibitor (Abb. 1-4). Seit Frühjahr 2001 ist die Substanz in den USA, seit November 2001 in Europa zur Therapie von Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver Chronisch-Myeloischer Leukämie (CML) zugelassen.⁴ Durch Translokation kommt es dabei zur Fusion des Bcr-Gens (*breakpoint cluster region*) mit dem Gen, das für die Abl-Tyrosinkinase kodiert. Das Produkt dieser Mutation ist das chimäre Bcr-Abl-Protein, eine Kinase mit gesteigerter Aktivität, die bei der überwiegenden Zahl der CML-Erkrankungen auftritt.³ Imatinib hemmt die Bcr-Abl-Kinase und kann daher sehr effektiv zur Behandlung der chronischen CML-Phase eingesetzt werden. In der später auftretenden Blastenkrise entfaltet es palliative Wirkung. Gerade in dieser Phase treten aber auch häufig Imatinib-Resistenzen durch Mutationen in der Bcr-Abl-Kinase auf.²⁹

Imatinib inhibiert neben der Bcr-Abl-Kinase auch die Kinasen PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) und c-Kit, welche unter anderem bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) verstärkt aktiv sind. Diese können ebenfalls mit Glivec[®] behandelt werden.^{3, 4}

Seit Januar 2008 ist Nilotinib (Tasigna[®], Novartis, **5**), ein Imatinib-Abkömmling, zur Behandlung der CML auf dem Markt verfügbar (Abb. 1-4). Es handelt sich um einen Bcr-Abl-Inhibitor der zweiten Generation, der Aktivität gegen die meisten Imatinib-resistenten Mutationen und zudem eine erhöhte Kinaseaffinität zeigt. Nilotinib wird zur Second-line-Therapie bei Patienten eingesetzt, die Imatinib nicht vertragen oder dagegen resistent sind.^{29, 30}

Dasatinib (Sprycel[®], Bristol-Myers Squibb, **6**) stellt ein weiteres Second-line-Therapeutikum zur Behandlung der Philadelphia-Chromosom positiven CML dar, das seit Dezember 2006 zugelassen ist, wenn zuvor eine Anwendung von Imatinib erfolglos war (Abb. 1-4). Das 2-Aminothiazol-Derivat ist ein sehr potenter Inhibitor der Bcr-Abl-Kinase. Dasatinib bindet an eine aktive, Imatinib dagegen an eine inaktive Konformation der Kinase. Die Resistenzproblematik von Imatinib wird darauf zurückgeführt, dass Mutationen im Bcr-Abl-Gen die Ausbildung der inaktiven Kinase-Konformation verhindern. Diese veränderten Kinasen können durch Imatinib nicht mehr gehemmt werden. Auf die Bindung von Dasatinib hat dies jedoch keine Auswirkung. Neben der Bcr-Abl-Kinase werden auch zahlreiche andere Kinasen von Dasatinib gehemmt, vor allem Src, PDGFR und c-KIT. Dasatinib hemmte in einer



Zu Beginn der Kinaseinhibitor-Entwicklung lag der Fokus auf der möglichst selektiven Inhibition einzelner Kinasen, um unerwünschte Nebenwirkungen gering zu halten. Mit zunehmendem Wissen über die Entwicklung von Tumorzellen wird jedoch deutlich, dass zahlreiche zum Teil eng miteinander verknüpfte Signalwege in Proliferation und Angiogenese maligner Zellen eingebunden sind, so dass durch Anwendung von Multikinase-Inhibitoren Redundanzen in Signalkaskaden überwunden werden können.^{31, 32}

Das Zusammenspiel zahlreicher zellulärer Faktoren lässt sich am Beispiel der Angiogenese verdeutlichen. Bis zu einer Größe von 1-2 mm werden die Zellen eines soliden Tumors durch Diffusion ernährt. Weiteres Wachstum ist nur durch ein eigenes Blutversorgungssystem möglich, welches eine Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten und Kohlendioxid sichert. Durch die Vaskularisierung können maligne Tochterzellen über Blut- und Lymphbahnen in andere Gewebe streuen. Die Angiogenese fördert also die

Metastasierung.^{31, 33, 34} Antiangiogen wirksame Substanzen stellen demnach eine vielversprechende Strategie in der Tumorthherapie dar, wie bereits an zugelassenen Therapeutika wie dem Antikörper Bevacizumab dargestellt. Besonders günstig ist, dass bei einem gesunden Erwachsenen eine basale Gefäßneubildung praktisch nicht stattfindet. Außer bei Wundheilung und Menstruation findet man eine Neo-Vaskularisierung nur bei pathologischen Prozessen, wie diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makuladegeneration am Auge und eben bei Tumoren. Eine antiangiogene Therapie sollte gesundes Gewebe also nicht beeinflussen und sich demnach durch gute Verträglichkeit auszeichnen.³⁵

Im Gegensatz zur Vaskulogenese bezeichnet Angiogenese die Neubildung von Gefäßen aus bereits differenzierten Endothelzellen, d.h. aus schon bestehenden Kapillaren, und zwar durch Aussprossung oder Einstülpung von Gefäßen.³³ Hierin ist ein weiterer Vorteil einer antiangiogenen Tumorthherapie zu sehen. Ausdifferenzierte Endothelzellen als Angriffspunkt sind genetisch stabiler als maligne Zellen, so dass die Entwicklung von Resistenzen durch Mutationen weniger wahrscheinlich ist.^{34, 35} Die Umwandlung eines nicht vaskularisierten Tumors zu einem vaskularisierten wird als „angiogener Switch“ bezeichnet. Dies ist der Zeitpunkt, an dem proangiogene Faktoren sich stärker ausprägen als ihre antiangiogenen Gegenspieler.³⁴ Den initialen Reiz stellt dabei eine lokale Hypoxie in den Zellen dar. Daraufhin werden vom Tumor selbst proangiogene Zytokine ausgeschüttet, unter anderem FGF 2 (*fibroblast growth factor 2*), Interleukin-8, Angiopoietin-2, PDGF (*platelet derived growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*).³⁶ VEGF bindet an Rezeptor-Tyrosinkinasen, die spezifisch im Endothelgewebe vorkommen. Man unterscheidet drei Typen, VEGF-R1 (FLT1), VEGF-R2 (KDR) und VEGF-R3 (FLT4).³⁷ Vor allem über den VEGF-Rezeptor 2 werden Endothelzellen zur Proliferation und Migration angeregt. VEGF wirkt zudem als *survival factor* für Endothelzellen und neu gebildete Gefäße. Außerdem wird die Gefäßpermeabilität erhöht, so dass weitere Signalmoleküle und Zellen herantransportiert werden können.

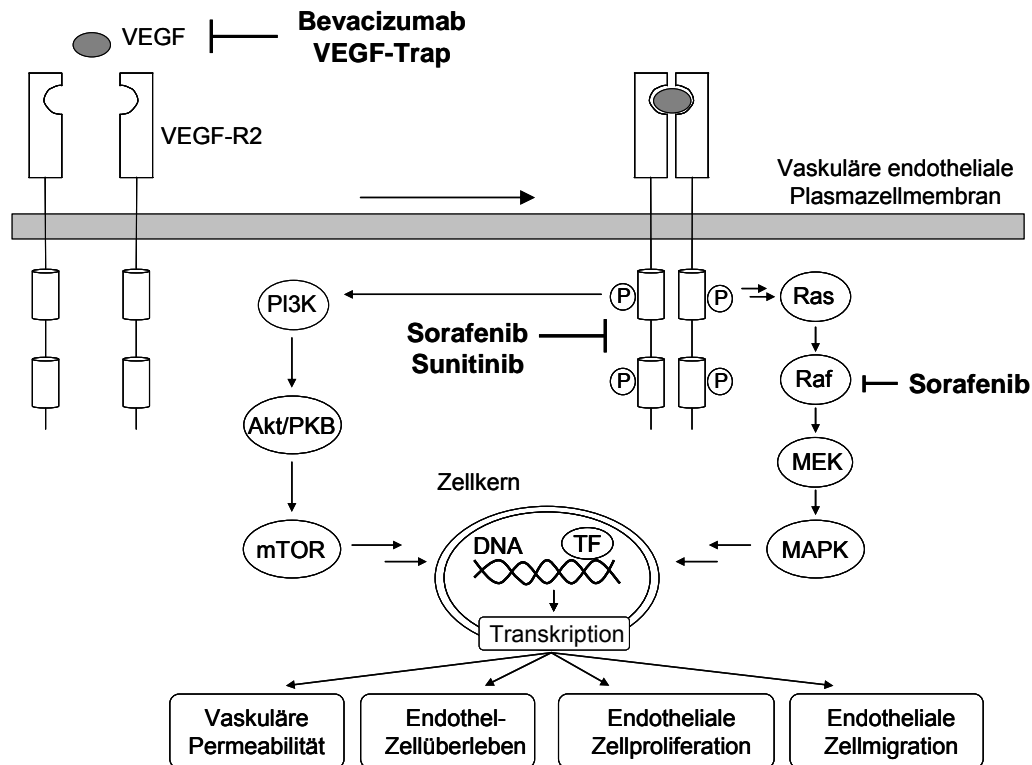


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Funktion von VEGF-R2
(modifiziert nach Garcia et al.³⁸ und Sridhar et al.³⁹)

VEGF: *vascular endothelial growth factor*, VEGF-R2: VEGF-Rezeptor 2, Ras: G-Protein mit GTPase Aktivität, Raf: Serin/Threonin-Kinase, MEK: MAPK/ERK Kinase, MAPK: *mitogen activated protein kinase*, PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*, Akt/PKB: *protein kinase B*, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, TF: Transkriptionsfaktoren.^{38, 40}

Abbildung 1-5 stellt schematisch die Wirkung von VEGF über VEGF-R2 auf die Endothelzell-Entwicklung dar. Die Bindung des Liganden VEGF an die RTK VEGF-R2 verursacht deren Dimerisierung. Intrazellulär kommt es durch Autophosphorylierungs-Prozesse zu einer Aktivierung von Signalkaskaden. In Abbildung 1-5 sind der Ras-Raf-MAPK- sowie der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg dargestellt. Durch die Signalweiterleitung kommt es zur Expression bestimmter Gene und schließlich zur Endothelzell-Aktivierung und Angiogenese.^{38, 39} Mit diesen Prozessen sind zahlreiche weitere Signalwege verknüpft, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet sind. Zudem werden diese Vorgänge auch über andere RTK vermittelt.³⁹

Eine weitere wichtige Rolle in der Angiogenese spielt die RTK Tie-2, die ebenfalls spezifisch in Endothelgewebe vorkommt. Über ihren Liganden Angiopoietin-1 ver-

mittelt sie unter anderem eine Stabilisierung des neu gebildeten Endothelzellen-Verbandes. Während VEGF über VEGF-R2 in der Angiogenese-Frühphase wirkt, ist eine Aktivierung von Tie-2 eher für eine spätere Phase der Gefäßneubildung von Bedeutung. Die Inhibition beider Kinasen würde demnach einen synergistischen anti-angiogenen Effekt bedeuten. Ebenfalls an der Angiogenese von Tumorzellen beteiligt sind die Mitglieder der PDGFR-Familie (*platelet derived growth factor receptor*). Dazu zählen die RTKs PDGFR- β , c-KIT, CSF1-R sowie FLT3.³² Die duale Inhibition von VEGF-R2 und PDGFR- β hat sich im Tiermodell zur Rückbildung von Tumor-Blutgefäßen gegenüber einer selektiven VEGF-R2-Hemmung als überlegen herausgestellt.³¹ PDGF-Rezeptoren beeinflussen nämlich auch Perizyten, welche die Endothelzellen als Membran umgeben und diese versorgen. Wird die Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen gestört, trägt dies zur Apoptose der Endothelzellen bei.^{34, 37} PDGFR-Kinasen fördern darüber hinaus auch direkt das Tumorwachstum.⁴¹ Auch Sunitinib (Sutent[®], Pfizer, **7**) hemmt mehrere Kinasen, wie VEGF-R1, 2 und 3, PDGFR- α und - β , c-KIT, FLT3 und die RET-Kinase (Abb. 1-6). Es war 2006 einer der ersten zugelassenen Multikinase-Inhibitoren, der zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten Nierenzellkarzinoms (*renal cell carcinoma*, RCC) nach Versagen einer Interferon- α oder Interleukin-2-Therapie auf den europäischen Markt kam. Bei RCC handelt es sich um einen stark vaskularisierten Tumortyp, bei dem häufig eine gesteigerte Aktivität von Raf1, EGFR, VEGF und VEGF-Rezeptoren festgestellt werden kann. Er ist kaum mit herkömmlichen Chemotherapien zu behandeln.⁴² Da die Tumorangiogenese bei Nierenzellkarzinomen stark von VEGF abhängt, ist hier die zielgerichtete VEGF-R-Inhibition sinnvoll, was nicht auf jeden Tumortyp zutrifft.³⁷ Außerdem wird Sunitinib bei gastrointestinalen Stromatumoren angewendet, die gegen Imatinib resistent sind.⁴³

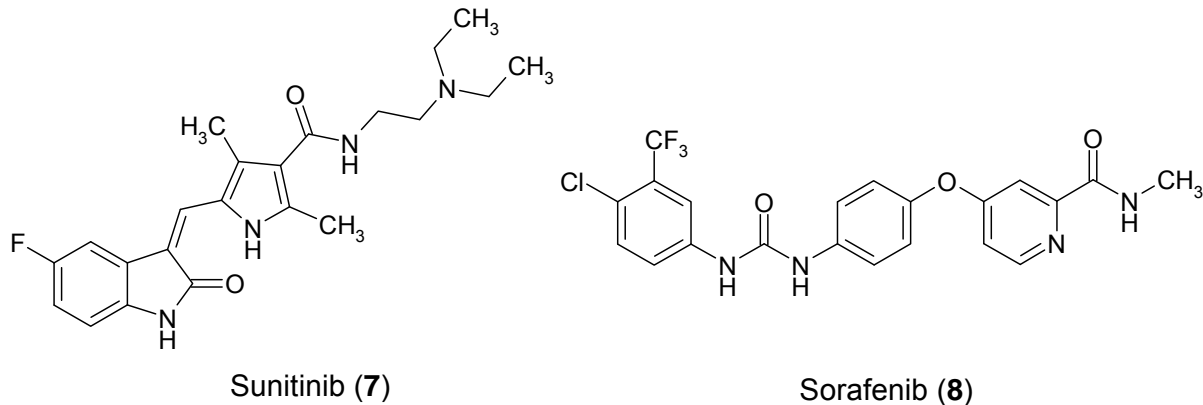


Abbildung 1-6: Multiple Kinaseinhibitoren

Etwa zeitgleich wurde der Multikinase-Inhibitor Sorafenib (Nexavar[®], Bayer, **8**) zugelassen (Abb. 1-6). Neben den Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGF-R2 und 3, PDGFR- β , FLT3, c-KIT und RET richtet sich die Wirkung von Sorafenib auch gegen verschiedene Isoformen der Serin/Threonin-Kinase Raf.⁴² Raf-Kinasen sind als Schlüsselenzyme des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs interessante Targets für eine zielgerichtete Tumorthérapie.^{39, 42} Sorafenib wird ebenfalls bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom eingesetzt. Eine Zulassung für weitere Indikationen, wie fortgeschrittenes Leberzellkarzinom und metastasierendes Melanom, soll folgen.⁴⁴

In Abbildung 1-5 ist die kinaseinhibitorische Wirkung von Sunitinib und Sorafenib auf Endothelzellen schematisch dargestellt. Eine Überaktivierung der dargestellten Ras-Raf-MAPK- und PI3K-Akt-mTOR-Signalwege spielt häufig bei RCC-Erkrankungen eine Rolle.⁴⁰

1.2.5 Allosterische und Substrat-kompetitive Kinaseinhibition

Die Bindung eines allosterischen Inhibitors erfolgt nicht am aktiven Zentrum und hat die Konformationsänderung des Enzyms, auch seiner Substrat-Bindestelle, zur Folge. Das Substrat, im Fall der Kinasen auch das ATP, kann nicht mehr gebunden und umgesetzt werden.⁴⁵ Nach Bogoyevitch und Fairlie⁴⁶ können auch Imatinib und Sorafenib als allosterische Inhibitoren bezeichnet werden, obwohl sie eine ATP-kompetitive Kinetik zeigen. Diese Definition wird dadurch erklärt, dass sie zwar an der ATP-Bindetasche angreifen, aber an eine inaktive Konformation ihrer jeweiligen Kinase binden und verhindern, dass die Umwandlung in die aktive Konformation statt-

finden kann. Diese Kinaseinhibitoren lassen sich auch als allosterische Effektoren bezeichnen.⁴⁵ Darüber hinaus werden „echte“ allosterische Inhibitoren beschrieben, die weder an Substrat- noch ATP-Bindetaschen binden und dementsprechend eine nicht-kompetitive Kinetik zeigen. Cumarin-Derivate sind beispielsweise allosterische MEK-Inhibitoren.⁴⁶ Schließlich werden Möglichkeiten untersucht, Kinasen substrat-kompetitiv zu hemmen.⁴⁶ Insgesamt sind diese Bemühungen noch längst nicht so weit fortgeschritten wie die Entwicklung von Inhibitoren, die mit ATP um eine Bindung konkurrieren, was sich in der Zahl der bereits auf dem Markt zugelassenen Substanzen widerspiegelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zielgerichtete Hemmung von Proteinkinasen eine wertvolle Bereicherung in der Behandlung von Tumorerkrankungen darstellt, die zuvor hauptsächlich aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie bestand. Eine Therapie mit niedermolekularen, oral verfügbaren Kinaseinhibitoren wie Imatinib muss zwar häufig lebenslang durchgeführt werden, da diese Substanzen meist nur zytostatisch wirken, zeichnet sich aber durch eine niedrige bis moderate Nebenwirkungsrate aus, vor allem im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapien.⁴² Die ständig fortschreitenden Erkenntnisse über Funktion und strukturellen Aufbau von Proteinkinasen und die zunehmende Erfahrung aus klinischen Studien sowie die Anwendung von zugelassenen Kinaseinhibitoren werden Einfluss auf die Entwicklung neuer Vertreter dieser Wirkstoffklasse haben, die durch gezielte strukturelle Veränderungen beispielsweise weniger anfällig für Resistenzentwicklungen sind.

1.3 Der Prozess der Wirkstoffentwicklung

Die beschriebenen zugelassenen Proteinkinase-Inhibitoren sind das Ergebnis eines erfolgreichen Wirkstoff-Entwicklungsprozesses der pharmazeutischen Industrie. Die Entwicklung von Sorafenib hat beispielsweise 11 Jahre in Anspruch genommen, vom ersten Screening nach einer geeigneten Leitstruktur bis hin zur Zulassung durch die FDA.⁴² Im Folgenden wird der lange, kosten- und arbeitsintensive Weg dargestellt, von der ersten Entdeckung einer chemischen Verbindung, die Aktivität in einem biochemischen Assay zeigt, bis hin zu einem Arzneistoff, der sich in der klinischen Anwendung durch Wirksamkeit und günstige pharmakokinetische Parameter auszeichnet. Grundsätzlich gelten die Betrachtungen für oral applizierte Wirkstoffe.

1.3.1 Die Auswahl eines geeigneten Targets

Am Anfang moderner Wirkstoffentwicklung steht die Auswahl eines geeigneten Zielmoleküls, des Targets. Die Rolle dieses Targetproteins in einem bestimmten pathophysiologischen Vorgang muss zunächst sichergestellt werden. Dies geschieht unter Anwendung zahlreicher interdisziplinärer Verfahren aus Biochemie, Zellbiologie und Bioinformatik. Entscheidend ist aber auch, ob die Proteinfunktion überhaupt durch niedermolekulare Verbindungen beeinflusst werden kann. Diese Eigenschaft des Targets wird als *drugability* bezeichnet und lässt sich vor allem dann beurteilen, wenn Informationen über den dreidimensionalen Aufbau des Zielproteins verfügbar sind.⁴⁷ Dazu dienen unter anderem Protein-Kristallstrukturen. Den höchsten Informationsgehalt haben Strukturen von Proteinen, die mit einem niedermolekularen Inhibitor kokristallisiert wurden, denn die Bindung eines Liganden hat meist eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge.⁴⁸ Solche Kristallstrukturen werden von der Protein Daten Bank (PDB) zugänglich gemacht.⁴⁷

Zur Vorhersage der *drugability* eines Targets werden die Eigenschaften der Bindungstaschen des Proteins beurteilt. Sind diese zu klein, zu flach oder zu lipophil, sind sie vermutlich nicht dazu geeignet, feste und spezifische Wechselwirkungen zu Inhibitormolekülen auszubilden. Die Struktur der Bindungstaschen lässt außerdem Rückschlüsse zu, ob die Entwicklung selektiver Inhibitoren möglich ist.⁴⁷

Proteinkinasen gelten als äußerst attraktive Targets in der Wirkstoffentwicklung.⁴⁹ Die Entwicklung selektiver Inhibitoren gelang trotz des stark konservierten Charak-

ters ihrer katalytischen Domäne. Durch Strukturaufklärung der Kinasen wurde deutlich, dass viele Inhibitoren nicht nur mit den Bereichen der ATP-Bindetasche wechselwirken, die vom ATP ausgefüllt werden, sondern beispielsweise auch mit den Aminosäure-Resten der *hydrophobic backpocket*, welche unter den verschiedenen Kinasen die größte Sequenzvariabilität aufweist. Aus den Übereinstimmungen und Verschiedenheiten der ATP-Bindungstaschen von Kinasen entstanden so Pharmakophor-Modelle zur rationalen Wirkstoffentwicklung.^{1, 3, 10, 24, 47}

1.3.2 Die Erzeugung von Hits, Leitstrukturen und Wirkstoffen

Nachdem ein geeignetes Target festgelegt wurde, wird klassischerweise durch experimentelles Screening untersucht, ob chemische Verbindungen eine biologische Aktivität gegenüber dem Target zeigen. Während sich die zu testenden Strukturen ursprünglich vor allem von Naturprodukten ableiteten, konnten durch Fortschritte in kombinatorischer Chemie und organischer Synthese Ende der 80er Jahre große Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen automatisiert dargestellt werden. Gleichzeitig bestand mit der Entwicklung des *high-throughput screening* (Hochdurchsatz-Screening, HTS) die Möglichkeit, hunderttausende Strukturen auf ihre biologische Aktivität mittels In-vitro-Assays zu untersuchen.⁵⁰ Die Substanzbibliotheken der pharmazeutischen Unternehmen enthalten mittlerweile häufig mehr als eine Millionen chemischer Verbindungen. Um diese große Anzahl bei akzeptablen Kosten testen zu können, wurden die HTS-Techniken immer weiter optimiert. Die auf das jeweilige Targetprotein abgestimmten HTS-in-vitro-Testverfahren werden auch als homogene Mix-und-Measure-Techniken bezeichnet, denn alle für die Testung und Detektion notwendigen Reagenzien werden in einer Vertiefung (*well*) einer Mikroplatte (*microplate*) vereinigt. Man testet Volumina von 3 bis 15 μl unter Verwendung von 384- oder 1536-*well*-Platten. Das Testergebnis kann ohne weitere Wasch- oder Abtrennungsschritte direkt ausgewertet werden.⁴⁹ Üblicherweise werden Einzelmessungen durchgeführt.⁵¹

Das Ziel von HTS ist die Entdeckung von niedermolekularen Verbindungen, die das untersuchte Target spezifisch inhibieren, gemessen an einem festgelegten Schwellenwert des jeweiligen Assays. Diese Verbindungen werden als Hit bezeichnet.^{49, 52} Dabei werden häufig falsch-positive Resultate erhalten. Diese können durch unspezifische Bindung des potentiellen Inhibitors, Bildung von Protein- oder

Substratpräzipitaten, Aggregatbildung niedermolekularer Verbindungen (promiskuitive Inhibition), geringe Reinheit der zu testenden Substanzen oder allgemein durch eine Störung des angewendeten Assays erklärt werden. Falsch-negative Ergebnisse können ihre Ursache in schlechter Löslichkeit der Hitstruktur haben und damit in einer zu geringen Konzentration des Inhibitors, aber auch in geringer Reinheit oder chemischer Instabilität.⁵¹ Entscheidend ist daher eine Validierung des anfänglichen Hits durch wiederholte Messung seiner Aktivität in biochemischen und zellulären Assays, sowie die Bestätigung von Identität und Reinheit des Moleküls.⁵²

Zu Beginn der HTS-Ära wurde in Projekten zur Wirkstoffentwicklung häufig der Fehler begangen, diese validierten Hits bereits als Leitstrukturen anzusehen. Der Begriff Leitstruktur bezeichnet den Prototyp einer chemischen Struktur, die in relevanten biochemischen oder pharmakologischen Testungen sowohl Aktivität als auch Selektivität zeigt. Durch strukturelle Modifikationen wird eine Leitstruktur soweit optimiert, dass sie als Wirkstoff in eine frühe klinische Phase eingehen kann. Die Grundstruktur einer Leitstrukturreihe sollte zudem neuartig und damit auch patentierbar sein. Ein häufiger Fehler früherer Wirkstoffentwicklungen bestand darin, eine Hitstruktur vorwiegend nach ihrer chemischen Stabilität und synthetischen Zugänglichkeit zu beurteilen. Im Zuge des weiteren Entwicklungsprozesses wurden vorrangig In-vitro-Affinität und Selektivität vollständig optimiert, weitere Eigenschaften wie Löslichkeit, Permeabilität oder metabolische Stabilität blieben jedoch zunächst unbeachtet. Eine nachträgliche strukturelle Veränderung dieser bereits optimierten Strukturen mit dem Ziel, biophysikalische Parameter zu verbessern, ist jedoch kaum möglich, ohne eine Verschlechterung der intrinsischen Affinität zu verursachen. Ungenügende Leitstruktur-Kriterien haben zur Folge, dass potentielle Wirkstoffe mit attraktiven In-vitro-Profilen, aber unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften in klinischen Studien versagen. Diese Erfahrungen und die damit verbundenen hohen Kosten, die vor allem am Ende der Wirkstoffentwicklung entstehen, haben zu einer Verbesserung von Beurteilungskriterien der einzelnen Entwicklungsstadien geführt (Abb. 1-7).⁵²

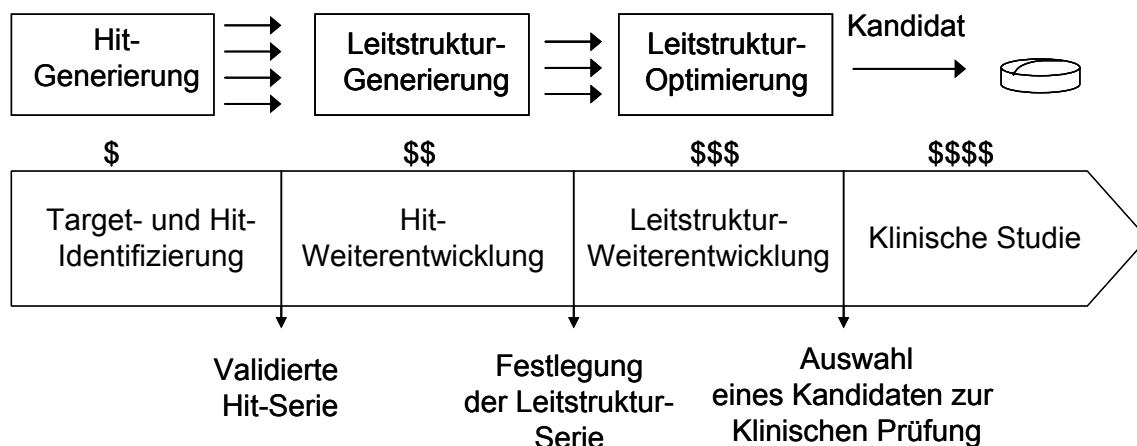


Abbildung 1-7: Die verschiedenen Stadien der Wirkstoffentwicklung
(modifiziert nach Bleicher et al.⁵²)

Nicht die Identifizierung eines Hits mit einem geeigneten Assay stellt die Herausforderung der Wirkstoffentwicklung dar, sondern vielmehr eine frühzeitige Berücksichtigung biophysikalischer Parameter. Aus der Phase der Hit-Identifizierung sollte eine validierte Hit-Serie hervorgehen. Damit werden strukturell ähnliche Verbindungen bezeichnet, für die nicht nur Spezifität und Selektivität, sondern auch physikochemische Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit, Lipophilie, Acidität und Flexibilität untersucht worden sind. Während der Hit-Weiterentwicklung werden diese Eigenschaften verbessert, so dass anschließend die Leitstruktur-Serie festgelegt werden kann. Diese Leitstruktur-Serie wird in einem nächsten Schritt soweit optimiert, dass nach der Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen schließlich die Auswahl eines geeigneten Wirkstoff-Kandidaten erfolgt, der in die klinische Prüfung eingeht.⁵² Neben der gewünschten pharmakologischen Wirkung, die über das betrachtete Target erzielt wird, sollte der Wirkstoff auch günstige Eigenschaften in Bezug auf Lösungsverhalten, Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt, metabolische Stabilität, Plasmaproteinbindung, Verteilung, Ausscheidung und toxikologisches Profil zeigen.⁵³ Diese Parameter werden unter dem Begriff ADMET zusammengefasst, was für Absorption, Distribution, Metabolisierung, Eliminierung und Toxikologie steht.⁵⁴ Abschließend lässt sich feststellen, dass Wirkstoff-Design die Optimierung zahlreicher Parameter erfordert. Um die Schwundquote und damit verbundene hohe Kosten in klinischen Studien möglichst gering zu halten, muss der Entwicklungs-

prozess durch multi-dimensionale Optimierung geprägt sein, d. h. durch frühzeitige und parallele Berücksichtigung der verschiedenen Wirkstoff-Parameter.⁵²

1.3.3 Fokussierte Bibliotheken zur Leitstruktur-Findung

Die Anwendung von HTS auf große, willkürlich zusammengesetzte Substanzbibliotheken schließt die Identifizierung von Hits mit ungünstigen biophysikalischen Eigenschaften nicht aus, sondern trägt vielmehr dazu bei.⁵⁵ Dies liegt darin begründet, dass die angewendeten In-vitro-Assays häufig keine zuverlässigen Aussagen über eine In-vivo-Wirkung zulassen.⁵⁶ Zudem werden die Verbindungen meist in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und vermessen, z. T. unter Zusatz von lösungsvermittelnden Tensiden, so dass auch Substanzen getestet werden können, die in wässrigem Medium nur schwer löslich sind.⁵⁰

Ein Ansatz, so früh wie möglich die gewünschten Wirkstoffparameter zu berücksichtigen, besteht darin, fokussierte Bibliotheken zu screenen. Darunter sind Bibliotheken zu verstehen, die unter Berücksichtigung eines bestimmten Schwerpunktes („Fokus“) nur eine eingeschränkte Anzahl an Substanzen enthalten. Im Folgenden werden drei Möglichkeiten beschrieben, eine solche Eingrenzung vorzunehmen.

Wirkstoffartige Bibliotheken

Es liegt nahe, von vornherein Bibliotheken zu entwerfen, in denen die Verbindungen bereits Wirkstoff-ähnliche physikochemische Eigenschaften haben. Diese Verbindungen werden als *drug-like* bezeichnet.⁵⁷ Nach Lipinsky's *rule of five* haben oral applizierte Wirkstoffe eine relative molare Masse (M_r) unter 500, der berechnete Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (cLogP), ein Maß für die Lipophilie, ist kleiner als 5, die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren (Hydroxyl- und Aminogruppen) im Molekül ist kleiner als 5 und die Gesamtzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (Sauerstoff- und Stickstoffatome) ist kleiner als 10. Diese Regel leitet sich aus der empirischen Untersuchung von Wirkstoffen mit bekannter günstiger Bioverfügbarkeit ab.⁵⁰ In Ergänzung sollte die Anzahl an frei-drehbaren Bindungen (*number of rotatable bonds*, NROT) im Wirkstoffmolekül maximal 7 sein und der polare Anteil der Moleküloberfläche (*polar surface area*, PSA) nicht mehr als 110 bis 140 Quadrat-Angström (\AA^2) betragen.⁴⁸ Außerdem zeigen diese Substanzen nur eine relativ niedrige Affinität gegenüber ihrem Target ($> 0.1 \mu\text{M}$).⁵⁷

Der Begriff „wirkstoffartig“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf physikochemische Parameter von tatsächlichen Wirkstoffen und darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass auch aus diesen wirkstoffartigen Substanzen zunächst ein Hit identifiziert werden muss, der über eine Leitstruktur zu einem Wirkstoff hin optimiert wird. Während dieser Optimierungsphase kommt es etwa durch Einführung lipophiler Gruppen durchschnittlich zu einer Erhöhung des relativen Molekulargewichts um 100 bis 200 sowie einer Zunahme des cLogP-Wertes um 1 bis 2 logarithmische Einheiten. Am Ende des Optimierungsprozesses stehen also Wirkstoffe, die zwar aus Substanzen mit wirkstoffähnlichen biophysikalischen Eigenschaften hervorgegangen sind, diese Eigenschaften aber im Zug der Substanzoptimierung wieder verloren haben.

Leitstrukturartige Bibliotheken

Ein günstigerer Ausgangspunkt zur Wirkstoffentwicklung sind Substanzbibliotheken aus leitstrukturartigen Verbindungen. Die sog. *lead-like* Moleküle zeichnen sich durch ein relatives Molekulargewicht von 200 bis 350 und einen cLogP-Wert von unter 1 bis 3 aus, also durch eine geringere Lipophilie im Vergleich zu wirkstoffartigen Strukturen.⁵⁶ Sie zeigen ebenfalls nur eine geringe Affinität ($> 0.1 \mu\text{M}$).⁵⁷ Diese Verbindungen sind gegenüber strukturellen Veränderungen während der Optimierungsphase toleranter. Nach Einführung lipophiler Gruppen erfüllen Leitstrukturen, die aus leitstrukturartigen Bibliotheken hervorgehen, immer noch die Kriterien der *rule of five*. Sie können also zu Wirkstoffen mit günstigen pharmakokinetischen Parametern weiterentwickelt werden.

Substanzbibliotheken aus Molekülfragmenten

Noch kleinere Strukturelemente bilden die Basis für Substanzbibliotheken aus Molekülfragmenten, die eine relative molare Masse von nur 120 bis 250 aufweisen. Die Affinität dieser Fragmente in biologischen Assays ist häufig sehr schwach und muss daher mit speziellen Methoden wie der Röntgenkristallstruktur-Analyse detektiert werden. Anschließend lassen sich verschiedene Fragmente, die einen günstigen Bindungsmodus am gewünschten Proteintarget zeigen, zu Liganden mit hoher Affinität verknüpfen. In Anlehnung an die *rule of five* wurde für Molekülfragmente eine *rule of three* aufgestellt: Fragmente, die als Hit aus einem Screening hervorgegangen

sind, haben eine relative molare Masse unter 300, der cLogP-Wert ist kleiner als 3 und die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren ist ebenfalls kleiner als 3. Zudem ist NROT kleiner als 3 und PSA gleich 60 \AA^2 .^{28, 48}

Es bleibt zu erwähnen, dass eine Einschränkung des zu testenden chemischen Raums auf fokussierte Substanzbibliotheken mit dem Ziel, potente Hits in biologischen Assays zu identifizieren und diese zu Wirkstoffen weiterzuentwickeln, ohne die Anwendung computerbasierter Selektionsmethoden nicht möglich wäre.⁵²

2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung fokussierter Substanzbibliotheken, die für eine Testung auf kinaseinhibitorische und antiproliferative Eigenschaften bereitgestellt werden sollten.

Da das Strukturelement der 1-Benzazepin-2-one in vivo antiproliferative Aktivität zeigt, sind im Vorfeld Verbindungsklassen synthetisiert worden, die dieses Motiv enthalten, wie die 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one, die auch als Paullone bezeichnet werden.⁵⁸ Vertreter dieser Klasse, wie z. B. das in Abbildung 2-1 dargestellte Alsterpaullon **9**, sind potente Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) sowie der Glykogen-Synthase Kinase-3 (GSK3) und zeigen außerdem antiproliferative Aktivität gegenüber Tumorzellen.^{59, 60} Basierend auf diesen Erkenntnissen sind weitere *d*-anellierte 1-Benzazepin-2-one dargestellt worden. Dazu zählen die von Kohfeld synthetisierten 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**10**) sowie die 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**11**) (Abb. 2-1).⁶¹

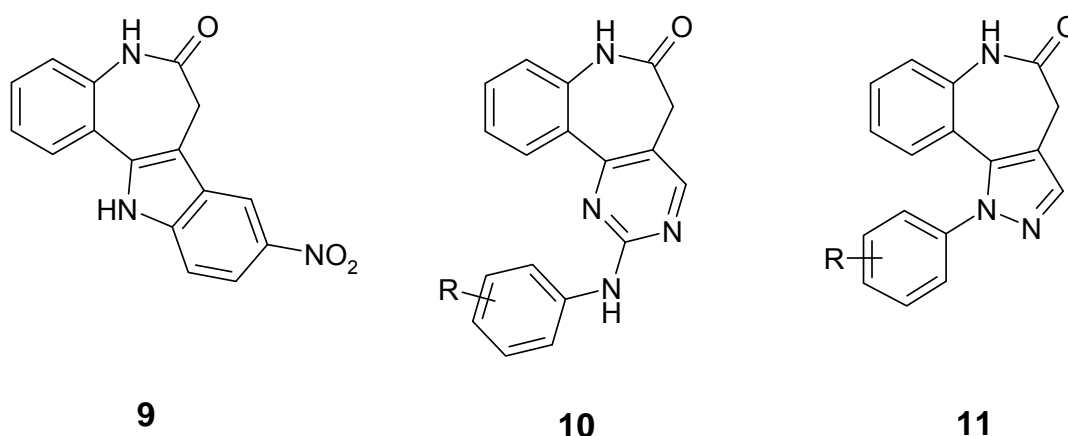


Abbildung 2-1: *d*-Anellierte 1-Benzazepinone

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten strukturelle Modifikationen an den Verbindungen **10** und **11** vorgenommen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht werden.

2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**10**) sind potente Multi-kinase-Inhibitoren. Sie hemmen in vitro VEGF-R2, VEGF-R3, Aurora A und B, TIE2, FAK und SRC in Konzentrationen im unteren mikro- bis nanomolaren Bereich. Zusätzlich wurden die Verbindungen **10** in biologischen Assays an Zellen getestet, die gezielt eine der in vitro inhibierten Kinasen überexprimieren. In vivo wurde allerdings eine deutlich schwächere Aktivität festgestellt. Eine mögliche Begründung dafür kann eine mangelnde Aufnahme der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**10**) in die Zellen sein.⁶¹

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Strukturmodifikationen die physikochemischen Eigenschaften in Bezug auf die Zellgängigkeit der Verbindungen **10** zu verbessern. Die Einführung eines zusätzlichen Stickstoffatoms in Position 11 (Verbindungstyp **12**) bzw. 10 (Verbindungstyp **13**) wurde angestrebt, um die Lipophilie der Strukturen herabzusetzen. Dies äußert sich in einem niedrigeren cLogP-Wert von **12** und **13** im Vergleich zur Ausgangsverbindung **10** (Abb. 2-2).

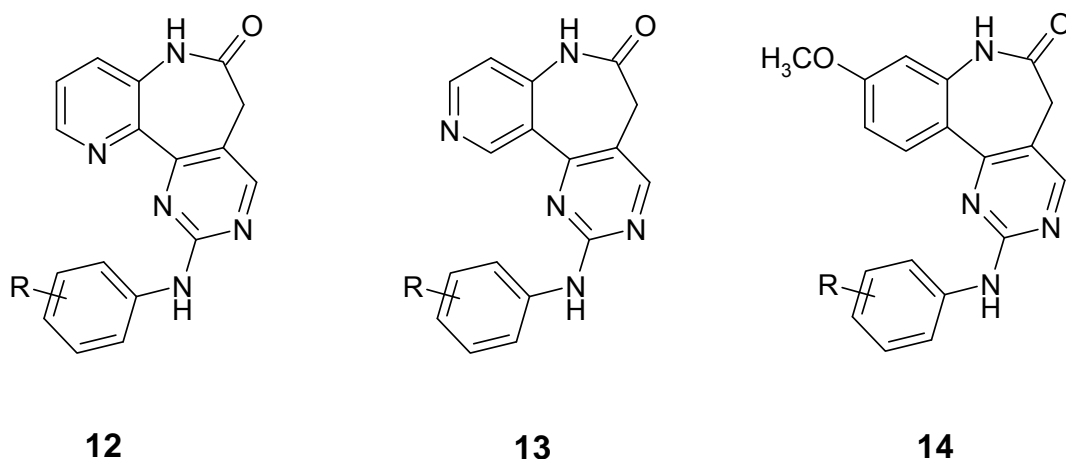
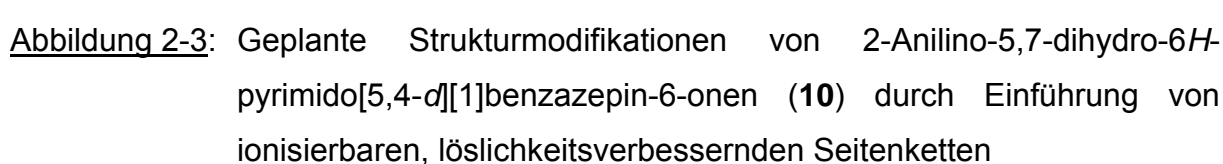
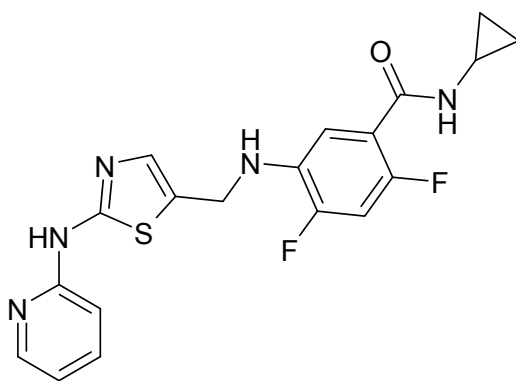
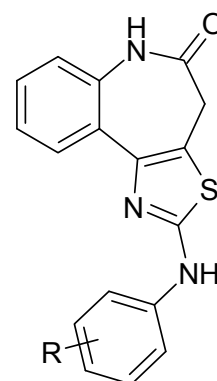


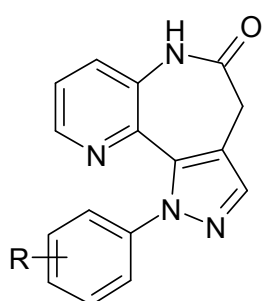
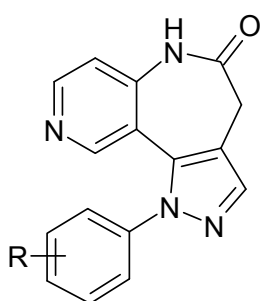
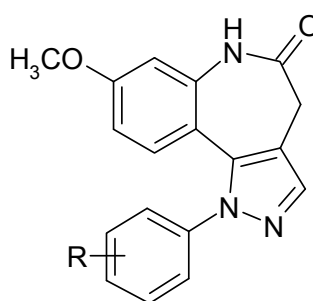
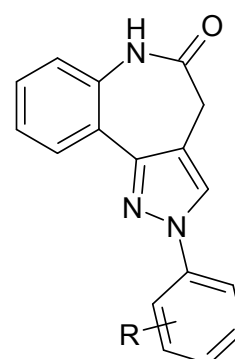
Abbildung 2-2: Darzustellende Anilinopyrimidin-Derivate

Die 9-Methoxyderivate **14** sollten dargestellt werden, da sie die Möglichkeiten bieten, löslichkeitsverbessernde Seitenketten in Position 9 ins Molekül einzubringen (Abb. 2-2), um zur Zielstruktur **15** zu gelangen (Abb. 2-3). Außerdem sollte der Einfluss der 9-Methoxygruppe auf die biologische Aktivität der Anilinopyrimidine untersucht werden.



**18****19**Abbildung 2-4: Aminothiazol-Derivate

1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**11**) wirken antiproliferativ gegenüber Tumorzelllinien (Abb. 2-1). Sie zeigen dabei eine charakteristische selektive Hemmung von humanen Leukämie- und Brustkrebszellen. Eine deutlich ausgeprägte kinaseinhibitorische Aktivität wurde allerdings nicht festgestellt, so dass ein anderer antiproliferativer Wirkmechanismus angenommen wird.⁶⁴ Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die in Abbildung 2-5 dargestellten Pyrazol-Grundstrukturen zu synthetisieren, und zwar die Azaanaloga **20** und **21** sowie die 8-Methoxyderivate **22**. Außerdem sollten die 1,3,4-substituierten Pyrazole **23** als Stellungsisomere zu der Ausgangsverbindung **11** erschlossen werden (Abb. 2-5).

**20****21****22****23**Abbildung 2-5: Pyrazol-Derivate

Schließlich sollten weitere neuartige, von α -anellierten 1-Benzazepin-2-onen abgeleitete, azaanaloge Heterozyklen dargestellt werden. Erstmals beschrieben wird die Umsetzung von 1-Benzazepin-2-onen mit Aminouracilen zu den 7,12-Dihydro-5H-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trienonen **24a-b** und **25a-b** und die Darstellung der azaanalogen Verbindungen **26a-b** und **27a-b** (Abb. 2-6). Die Strukturen **24c-f** sind von Dunkel beschrieben worden.⁶⁵ In Anlehnung daran sollten die Methoxyderivate **25c-f** sowie die Azaanaloge **26c-f** und **27c-f** synthetisiert werden (Abb. 2-6).

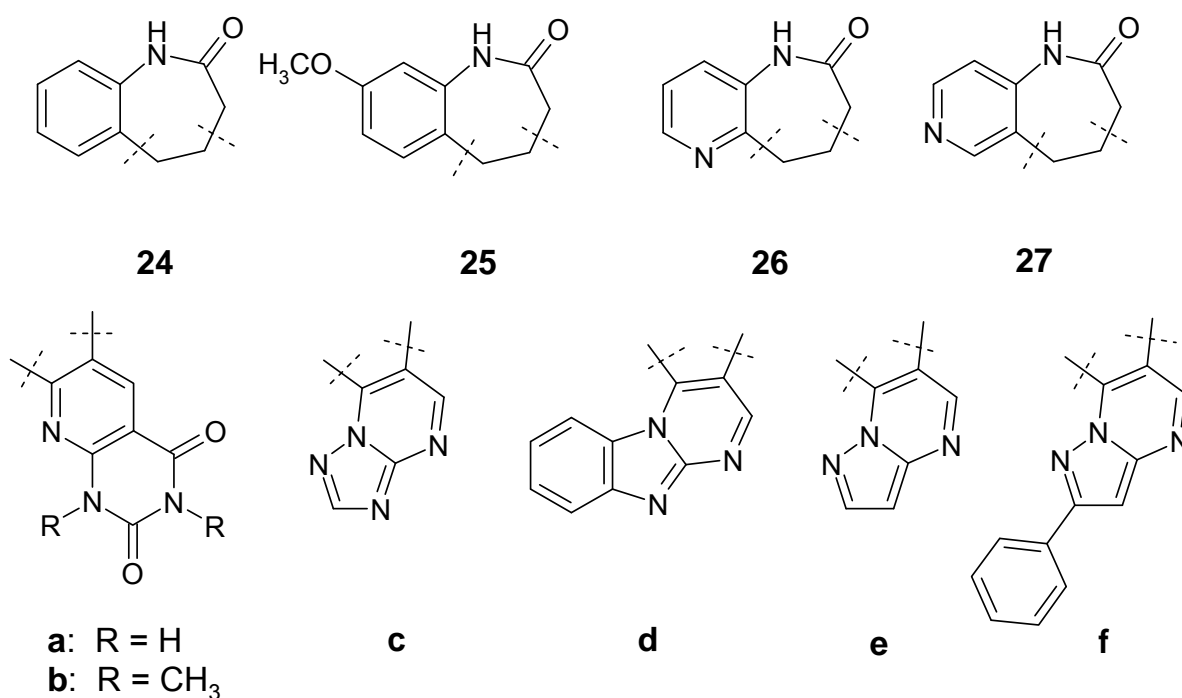


Abbildung 2-6: Heterozyklische α -anellierte 1-Benzazepinone und azaanaloge Verbindungen

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen sollten dann für die Testung auf Inhibition tumorrelevanter Proteinkinasen sowie antiproliferative Aktivität gegenüber Tumorzellen bereitgestellt werden. Aufgrund der so erhaltenen Daten war abschließend zu beurteilen, ob sich durch strukturelle Modifikationen die physikochemischen Parameter der einzelnen Strukturklassen und damit die wirkstoffartigen Eigenschaften verbessert haben.

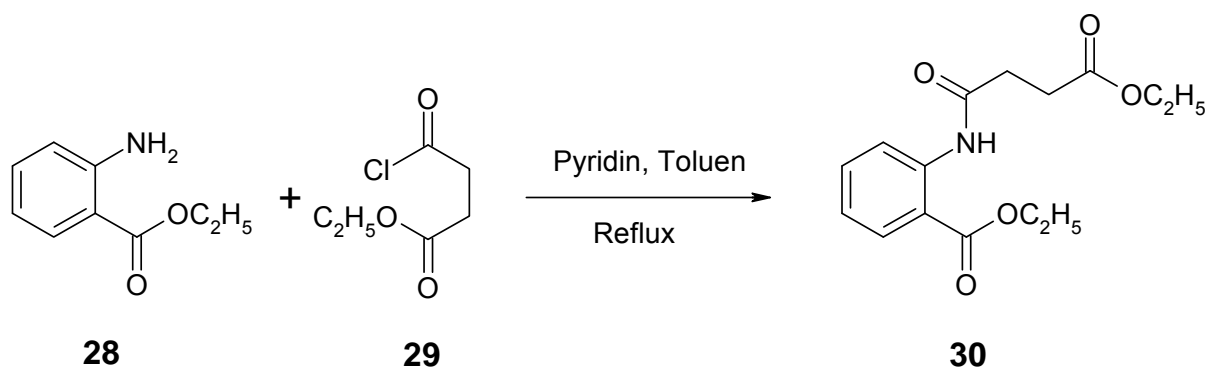
3 Synthesen

3.1 Synthese der 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione und azaanaloger Derivate

Die 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **46** und **49** sowie die azaanalogen Derivate **47** und **48** sind die zentralen Ausgangsverbindungen der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten *d*-anellierten 1-Benzazepinone. Nachfolgend wird zunächst die Synthese der jeweiligen Vorstufen beschrieben.

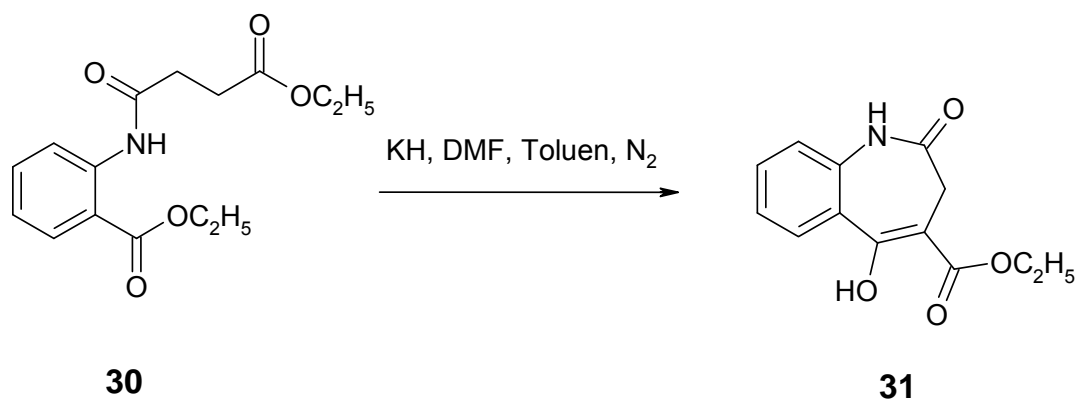
3.1.1 Synthese des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions

Die Synthese des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**32**) erfolgte nach einer Vorschrift von Kunick.⁶⁶ Anthranilsäureethylester (**28**) wurde mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) und Pyridin als Hilfsbase in Toluol zum 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**30**) umgesetzt (Schema 3-1).



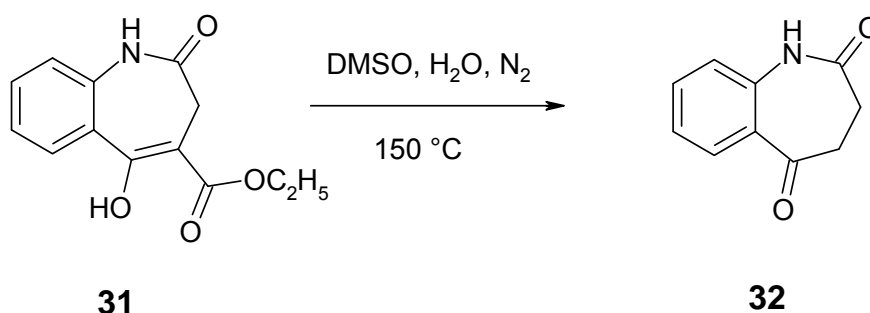
Schema 3-1: Darstellung des 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylesters (**30**)

Durch Dieckmann-Zyklisierung mit Kaliumhydrid in einem DMF-Toluol-Gemisch unter Stickstoff-Atmosphäre wurde das Amid **30** in den enolischen 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**31**) überführt (Schema 3-2).



Schema 3-2: Darstellung des 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylesters (**31**)

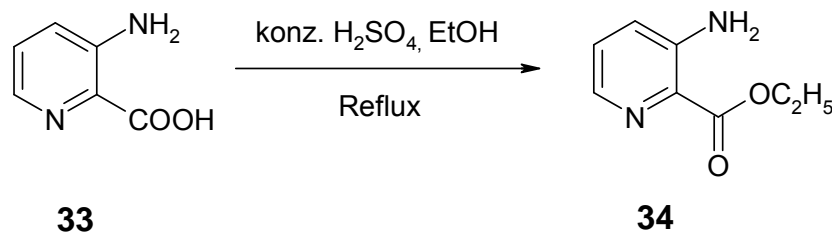
Das 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**32**) wurde schließlich durch Dealkoxycarbonylierung von **31** in wasserhaltigem DMSO gewonnen (Schema 3-3).



Schema 3-3: Darstellung des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**32**)

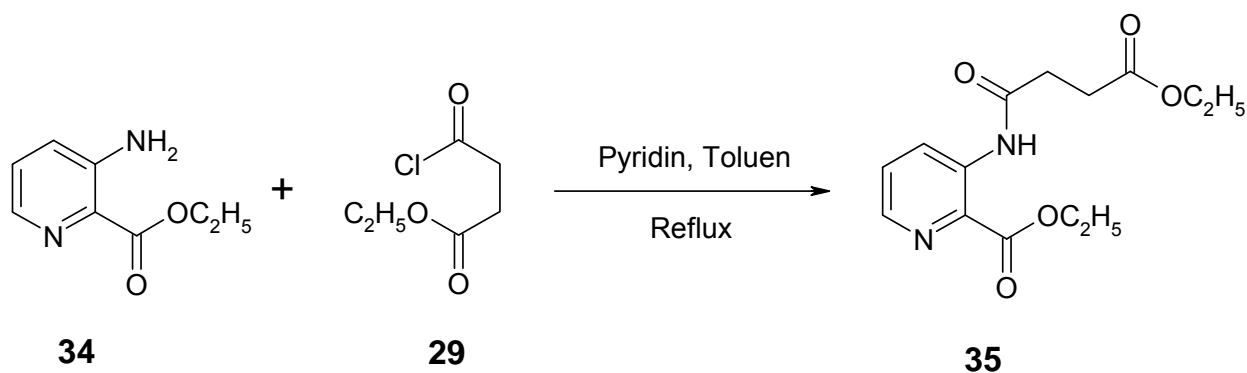
3.1.2 Synthese des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions

Die käuflich erwerbbar 3-Aminopicolinsäure (**33**) wurde nach einer Vorschrift von Carpino et al. mit absolutem Ethanol und konzentrierter Schwefelsäure zum 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**34**) umgesetzt.⁶⁷ Um akzeptable Ausbeuten zu erhalten, wurde die Reaktionszeit für die Veresterung in Anlehnung an Taylor et al.⁶⁸ und Stukenbrock⁶⁹ auf 96 h verlängert (Schema 3-4).



Schema 3-4: Darstellung des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters (**34**)

Der 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**35**) wurde nach Lauenroth durch Umsetzung von **34** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) in siedendem Toluol mit Pyridin als Hilfsbase dargestellt (Schema 3-5).⁷⁰



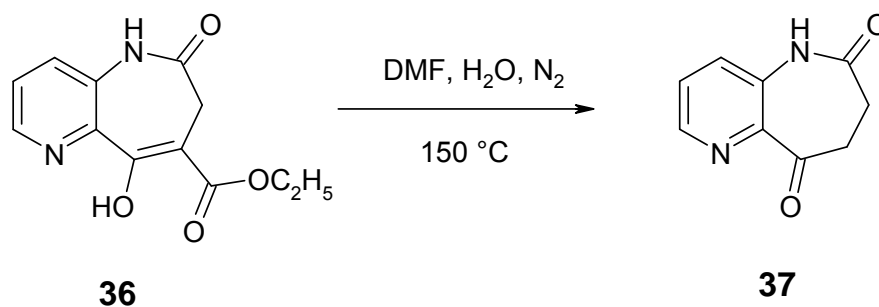
Schema 3-5: Darstellung des 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylesters (**35**)

Das Acylierungsprodukt **35** reagierte in einer Dieckmann-Zyklisierung mit Kaliumhydrid in einem DMF-Toluol-Gemisch unter Stickstoff-Atmosphäre, wodurch der enolisiert vorliegende 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**36**) entstand (Schema 3-6).⁷⁰



Schema 3-6: Darstellung des 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]-azepin-8-carbonsäureethylesters (**36**)

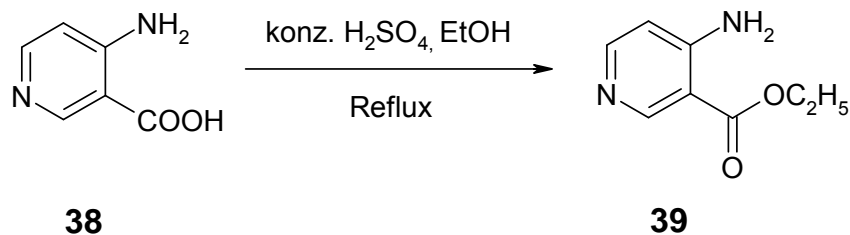
Nach Dealkoxycarbonylierung in wasserhaltigem DMF unter Stickstoff-Atmosphäre konnte das 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**37**) gewonnen werden (Schema 3-7).⁷⁰



Schema 3-7: Darstellung des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions (**37**)

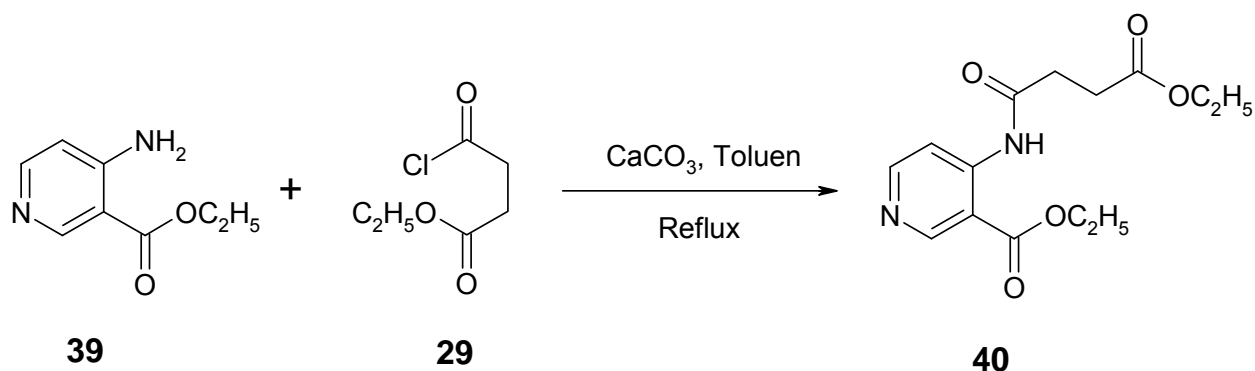
3.1.3 Synthese des 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dions

4-Aminonicotinsäure (**38**) stellt die Ausgangsverbindung zur Darstellung des 4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylesters (**39**) dar. Die Veresterung erfolgte ebenfalls nach einer Vorschrift von Taylor, wobei die Reaktionszeit wiederum von den angegebenen 70 h auf 96 h erhöht wurde, um eine angemessene Ausbeute zu erhalten (Schema 3-8).^{68, 69}



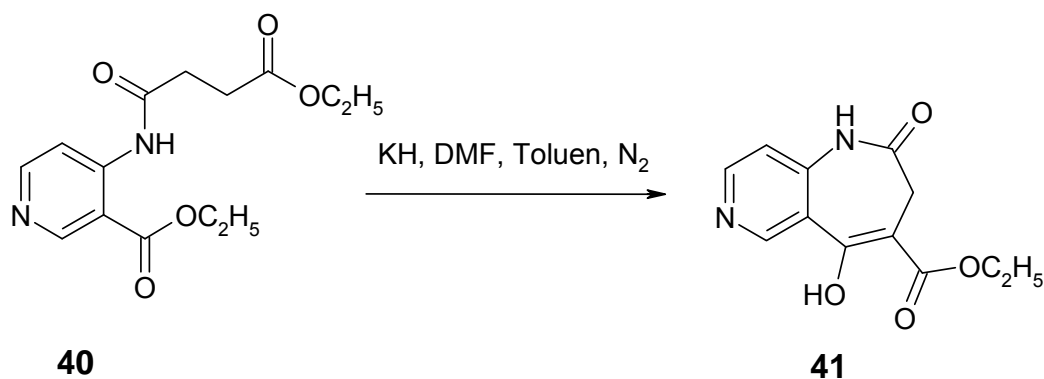
Schema 3-8: Darstellung des 4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylesters (**39**)

Die weitere Umsetzung wurde in Anlehnung an Lauenroth und Stukenbrock analog zu dem bereits beschriebenen 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**37**) durchgeführt.^{69, 70} 4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**39**) wurde dabei mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) in siedendem Toluol zum 4-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**40**) umgesetzt, wobei Calciumcarbonat als Hilfsbase eingesetzt wurde (Schema 3-9).



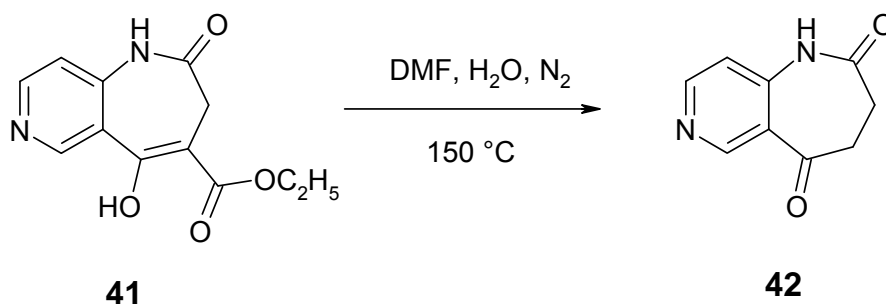
Schema 3-9: Darstellung des 4-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylesters (**40**)

Eine Dieckmann-Kondensation mit Kaliumhydrid in DMF/Toluol unter Stickstoff-Atmosphäre überführte **40** in den 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-4-carbonsäureethylester (**41**) (Schema 3-10).



Schema 3-10: Darstellung des 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-4-carbonsäureethylesters (**41**)

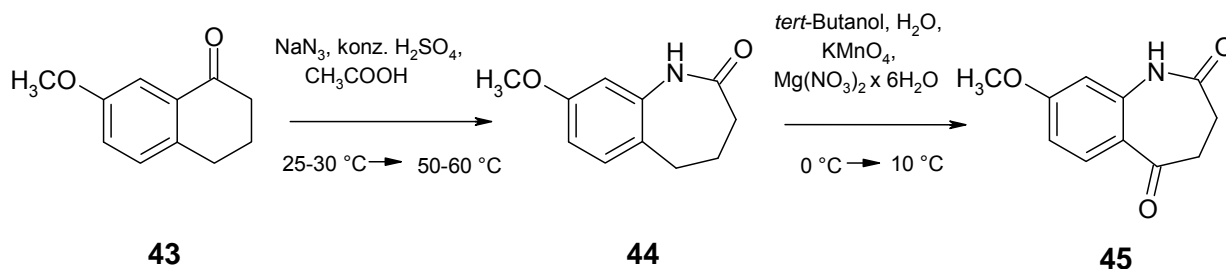
Das 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**42**) entstand wiederum durch Dealkoxycarbonylierung in wasserhaltigem DMF unter Stickstoff-Atmosphäre (Schema 3-11).



Schema 3-11: Darstellung des 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dions (**42**)

3.1.4 Synthese des 8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions

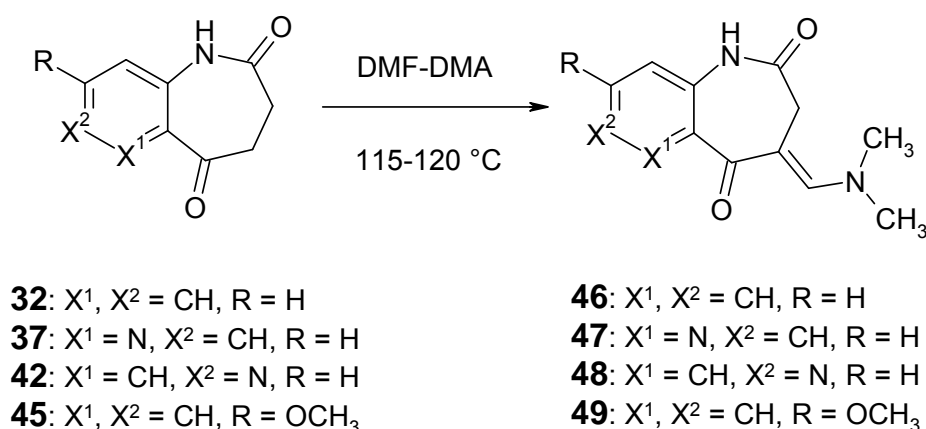
Nach einer Vorschrift von Prühs wurde das 8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**45**) aus 7-Methoxy-1-tetralon (**43**) synthetisiert. **43** wurde zunächst in einer Schmidt-Reaktion unter Ringerweiterung mit Natriumazid und konzentrierter Schwefelsäure in Eisessig zu 8-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-1-benzazepin-2-on (**44**) umgesetzt, welches anschließend mit Kaliumpermanganat und Magnesiumnitrat-Hexahydrat in *tert*-Butanol und demineralisiertem Wasser zu **45** oxidiert wurde. Überschüssiges Oxidationsmittel wurde durch eine Wasserstoffperoxid-Schwefelsäure-Lösung entfernt (Schema 3-12).⁷¹



Schema 3-12: Darstellung des 8-Methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dions (**45**)

3.1.5 Synthese der Enaminoketone

Chen und Gilman setzen 3,4-Dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**32**) mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMF-DMA) bei $115-120^\circ\text{C}$ zu 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) um.⁷² In Analogie dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die Enaminoketone 8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**47**) und 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**48**) aus den entsprechenden Pyridoazepindionen **37** und **42** sowie 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) aus 8-Methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion **45** dargestellt (Schema 3-13).



Schema 3-13: Darstellung der Enaminoketone **46**, **47**, **48** und **49**

Chen und Gilman beschreiben für das Enaminoketon **46** im ^1H -NMR-Spektrum in $\text{DMSO}-d_6$ bei $\delta = 3.25$ ppm ein Singulett mit einer Intensität von 8 Protonen, dem sie die Azepinmethylen-Gruppe und die beiden Methylgruppen zuordnen.⁷² Für das erstmalig in dieser Arbeit beschriebene 8-[(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5H-pyrido-[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) wurde bei der ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchung in $\text{DMSO}-d_6$ ein Singulett mit der Intensität 6.2 Protonen bei 3.24 ppm gefunden. Dieses Signal wurde den 6 Protonen der Aminomethyl-Gruppen zugeordnet. Eine Vermessung der Substanz in CHCl_3-d_1 zeigte neben einem Singulett bei 3.30 ppm mit einer Intensität von 6 Protonen ein breites Singulett bei 3.42 ppm mit einer Intensität von 1.9 Protonen. Dieses breite Singulett wird von der azepinischen Methylen-Gruppe hervorgerufen und ist in $\text{DMSO}-d_6$ von dem Wasserpeak bei 3.35 ppm überlagert (Abb. 3-1). Die Vermessung von **46** in CHCl_3-d_1 führte zu ähnlichen Ergebnissen. Dementsprechend zeigte ein HSQC-Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*) mit **47** in $\text{DMSO}-d_6$ keine Korrelation zwischen dem beschriebenen Singulett bei 3.24 ppm und dem ^{13}C -NMR-Signal des sekundären Kohlenstoffatoms der Azepinmethylen-Gruppe bei 30.8 ppm. Letzteres konnte aufgrund seiner Lage im ^{13}C -DEPT-Spektrum eindeutig zugeordnet werden.

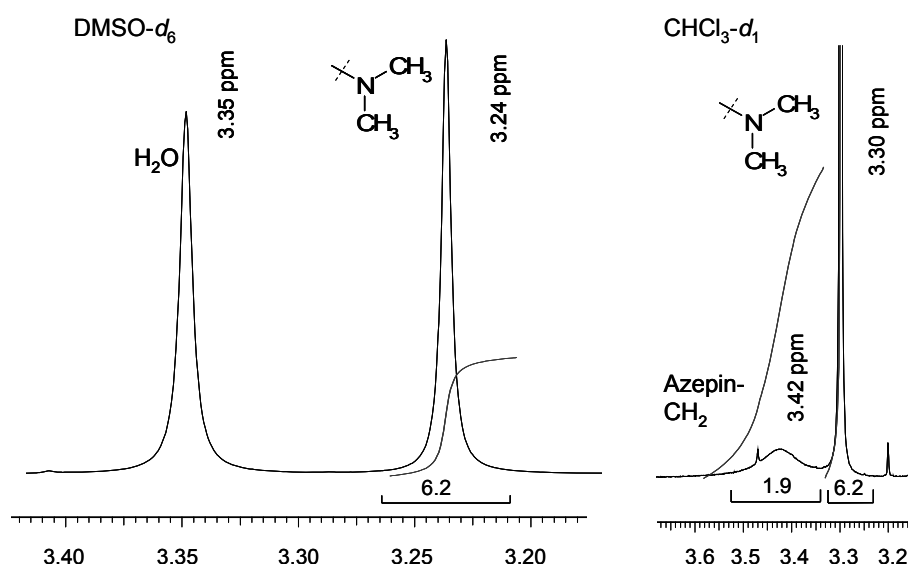


Abbildung 3-1: ^1H -NMR-Ausschnitt von 8-[(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) in $\text{DMSO}-d_6$ (links) und CHCl_3-d_1 (rechts).

Aufgrund von NOE-Untersuchungen (nuclear overhauser effect) und Berechnungen der thermodynamischen Stabilität von Enaminonen des Typs **46** vermutete Dunkel das Vorliegen der *E*-Konfiguration für diese Strukturen.⁶⁵ Dies konnte für 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) durch eine Röntgenkristallstruktur-Analyse bestätigt werden (Abb. 3-2).

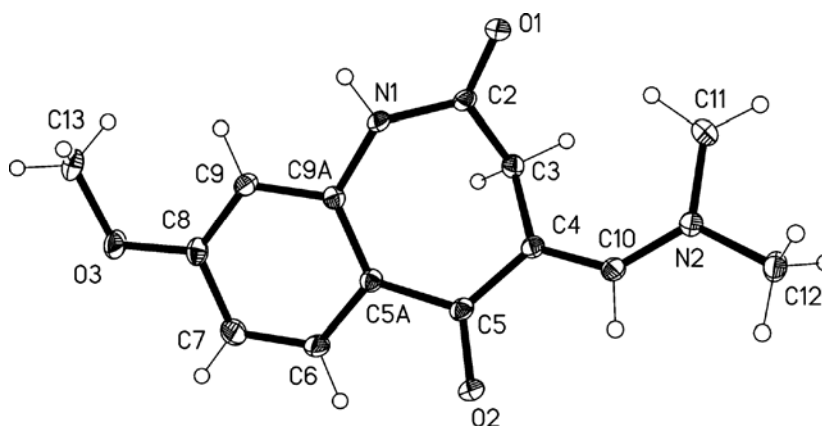


Abbildung 3-2: Röntgenstruktur des Enaminons **49**

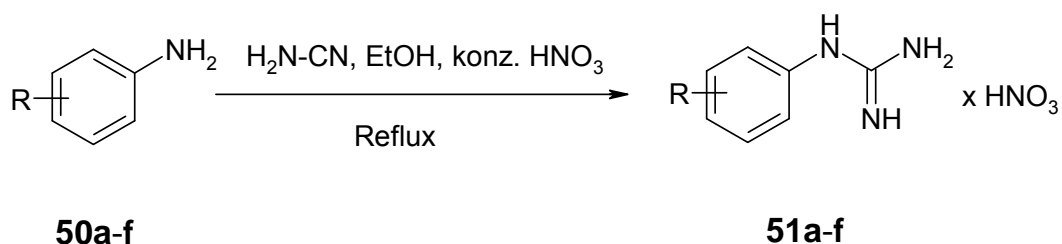
Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

3.2 Synthese der Anilinopyrimidine

Die einzelnen Anilinopyrimidin-Derivate wurden durch Umsetzung der Enaminone **46**, **47**, **48** und **49** mit Arylguanidiniumnitraten **51** erhalten. Im Folgenden wird die Synthese der Edukte **51** und der verschiedenen Anilinopyrimidin-Derivate beschrieben.

3.2.1 Synthese der Arylguanidiniumnitrate

Die Darstellung der Arylguanidiniumnitrate **51** erfolgte nach einer von Tavares et al. beschriebenen Methode, die von Kohfeld und Berger modifiziert wurde.^{61, 73, 74} Die Anilinderivate **50a-f** wurden in Ethanol zunächst mit konzentrierter Salpetersäure (65 %) und anschließend mit einer 50%igen wässrigen Cyanamid-Lösung versetzt und für ca. 18 h zum Rückfluss erhitzt (Schema 3-14). Das jeweilige Produkt **51a-f** wurde durch Zugabe von gekühltem Diethylether ausgefällt und durch Umkristallisation aus 2-Propanol gereinigt.

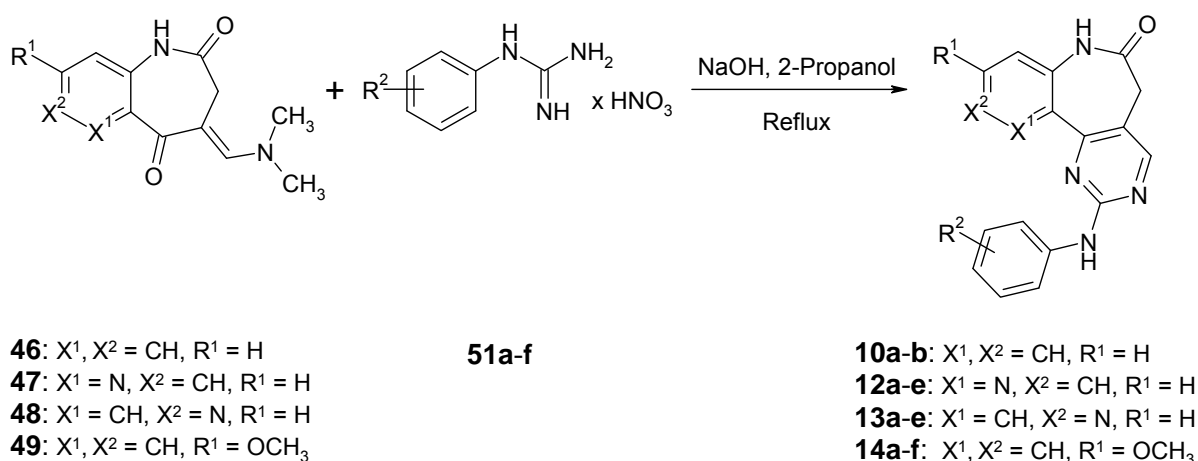


Schema 3-14: Darstellung der Arylguanidiniumnitrats **51a-f**

Substituenten R siehe Abbildung 3-3

3.2.2 Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

Kohfeld synthetisierte die Anilinopyrimidine **10** nach einem von Moffat et al. beschriebenen Verfahren.^{64, 75} Ein Äquivalent des Enaminons **46** wurde mit 1.2 Äquivalenten eines Arylguanidiniumnitrats **51** und 1.2 Äquivalenten Natriumhydroxid in 2-Propanol zum Rückfluss erhitzt (Schema 3-15). Die gewünschten Produkte **10** fielen nach Abkühlen aus dem Reaktionsgemisch aus. Zur Aufreinigung musste zunächst gründlich mit Wasser gewaschen werden, um anorganische Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde aus Ethanol umkristallisiert.



Schema 3-15: Darstellung der Anilinopyrimidine **10, 12, 13** und **14**

Substituenten R² siehe Abbildung 3-3

Die azaanalogen Verbindungen **12a-e** und **13a-e** konnten nach dieser Methode aus den entsprechenden Enaminonen **47** und **48** dargestellt werden (Schema 3-15). Die Umsetzung mit *N*-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)guanidiniumnitrat **51f** zu **12f** und **13f** gelang nicht, da die entstandenen Produkte nicht rein isoliert werden konnten. 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on **12** und 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[4,3-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on **13** stellen neuartige heterozyklische Grundkörper dar, die erstmalig in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Die 9-Methoxy-Derivate **14a-f** wurden ebenfalls nach der von Kohfeld angewendeten Methode synthetisiert (Schema 3-15).

Die Abbildung 3-3 gibt einen Überblick über die hergestellten Anilinopyrimidine **12a-e**, **13a-e** und **14a-f**. Sie stellen Strukturanaloga der Verbindungen **10a-f** dar, die bei Kohfeld die stärkste kinaseinhibitorische Aktivität zeigten.⁶¹

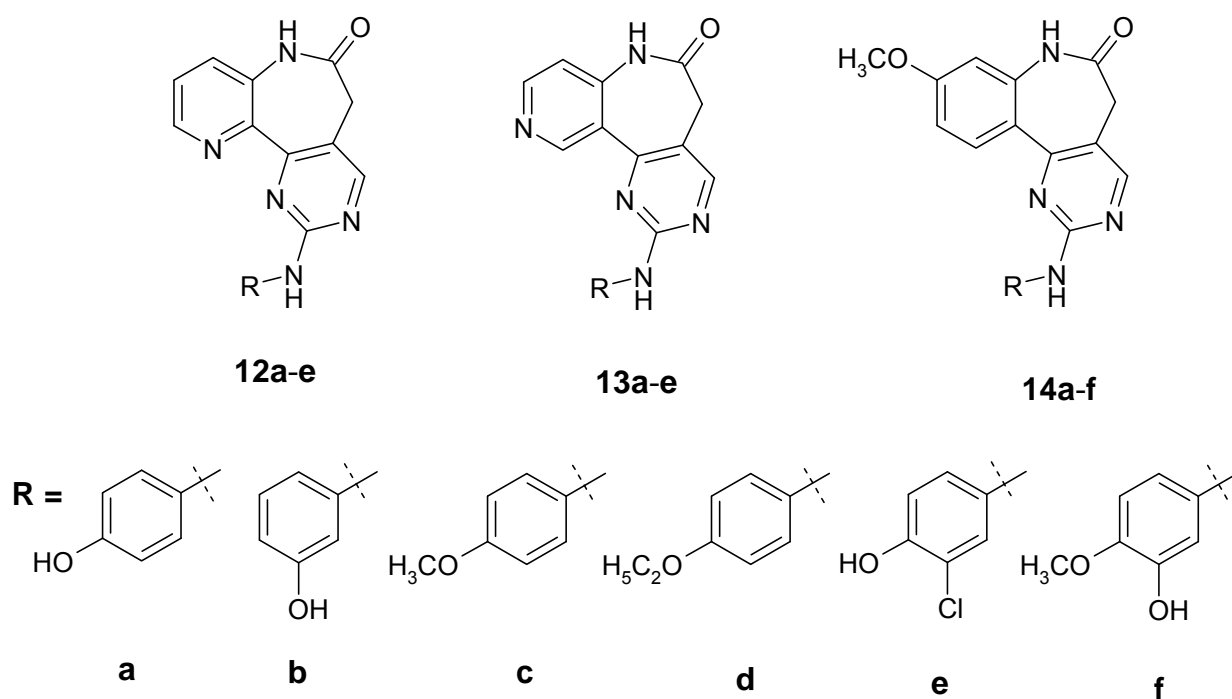


Abbildung 3-3: Synthetisierte Anilinopyrimidin-Derivate **12a-e**, **13a-e** und **14a-f**

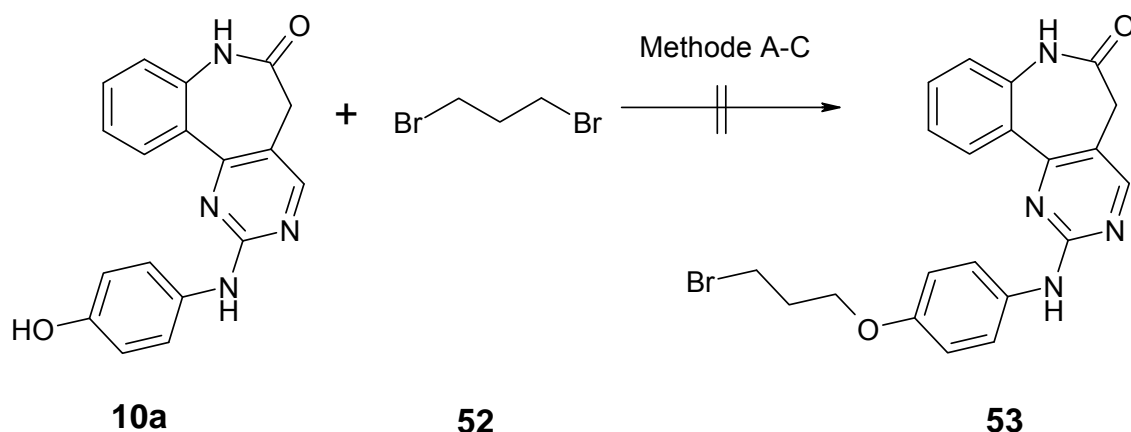
3.2.3 Synthese der Aminoalkoxy-Anilinopyrimidine

Es sollte untersucht werden, ob sich durch Anknüpfung solubilisierender Aminoalkoxy-Seitenketten an das Grundgerüst der Anilinopyrimidine **10** die Wirkung dieser Verbindungen in zellulären Systemen verbessern lässt. Als Anknüpfungspunkte sollten dazu Hydroxylgruppen im Molekül dienen, und zwar ausgehend von den 9-Methoxyderivaten **14** nach Etherspaltung in Position 9 (Zielstruktur **15**) bzw. in 4'-Position der Ausgangsverbindung **10a** (Zielstruktur **16**, Abb. 2-3).

Untersuchungen zum Bindemodus der Anilinopyrimidine **10** in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 haben ergeben, dass der 2-Anilinrest vermutlich in Richtung der *solvent accessible region* orientiert ist (siehe Kapitel 4.3.4). Eine Wechselwirkung zu dieser *solvent accessible region* wirkt sich vor allem auf Bindungsaffinität sowie die ADME-Eigenschaften eines Liganden aus.¹ Aminoalkoxy-Funktionen in 4'-Position könnten daher geeignet sein, die Zellgängigkeit der Verbindungen **10** zu verbessern.

Die alkylierten Verbindungen des Typs **16** sollten ausgehend von 2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on **10a** dargestellt werden. Nach einer Vorschrift von Möllenbeck wurde zunächst versucht, **10a** mit Dibrompropan (**52**) und Kaliumcarbonat zu einer Bromalkoxy-substituierten Verbindung **53** umzusetzen, an die über den Bromsubstituenten unterschiedliche Aminreste eingeführt werden sollten (Schema 3-16).⁷⁶ Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen angewandt (Schema 3-16, Methoden A-C). Die Lösemittel wurden getrocknet eingesetzt.

In Aceton als Lösemittel zeigte sich das Edukt **10a** sehr schwer löslich (Schema 3-16, Methode A). Auch nach langen Reaktionszeiten (> 24 h) wurde keine Umsetzung des Edukts beobachtet, obwohl das Reaktionsgemisch zum Rückfluss erhitzt und das Reagenz **52** in zehnfachem Überschuss eingesetzt wurde. In DMSO als Lösemittel zeigte **10a** zwar eine bessere Löslichkeit, das Edukt setzte sich jedoch auch nach Reaktionszeiten von über 60 h kaum um (Schema 3-16, Methode B). Es konnte kein Produkt isoliert werden. Die Versuchsbedingungen wurden nach Chanda et al. dahingehend variiert, dass DMF als Lösemittel verwendet wurde (Schema 3-16, Methode C).⁷⁷ Nach über 30-stündigem Rühren bei 80 °C hatte sich das Edukt noch immer nicht komplett umgesetzt. Nach Gießen in Wasser konnte ein Niederschlag abgetrennt werden, der allerdings ein Gemisch darstellte.



Schema 3-16: Versuche zur Darstellung der Bromalkoxy-Verbindung **53**

Methode A: K_2CO_3 , Aceton, Reflux

Methode B: K_2CO_3 , DMSO, 60-70 °C

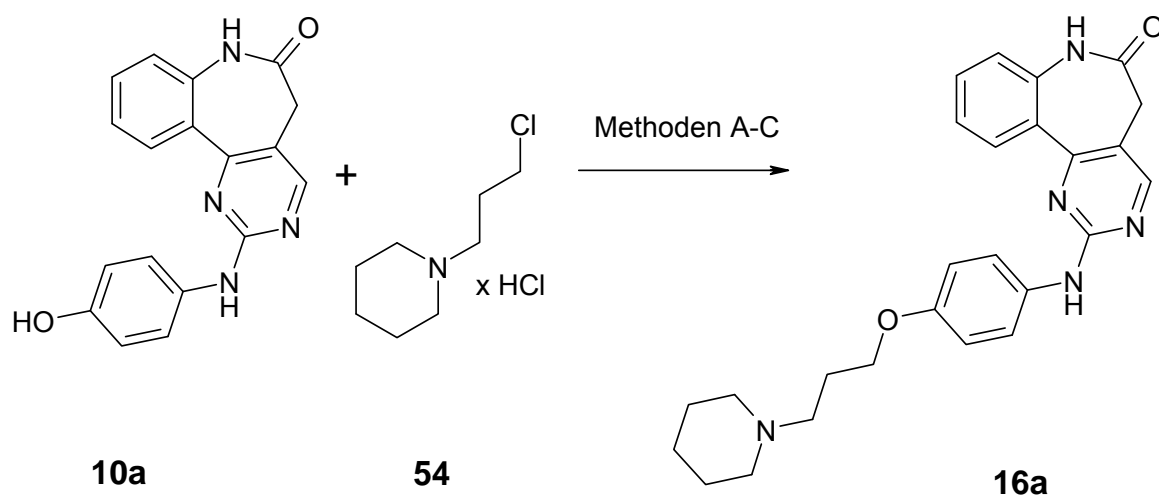
Methode C: K_2CO_3 , DMF, 80 °C

Die Ausgangsstruktur **10a** weist neben der phenolischen Hydroxylgruppe in 4'-Position noch weitere reaktive Zentren auf, die für eine Alkylierung zur Verfügung stehen, wie der Lactam-Stickstoff in 7-Position oder der 2-Anilin-Stickstoff. Daher kann es zur Bildung von Produktgemischen kommen. Eine selektive Alkylierung zu dem gewünschten Zwischenprodukt **53** konnte nicht durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Zielstruktur **16** zu erhalten, besteht in der direkten Umsetzung des 4'-Hydroxyanilinopyrimidins **10a** mit halogenalkylierten Aminen. Dies konnte beispielsweise von Wieking an Phenolderivaten mit *N*-(4-Brombutyl)-phthalimid in wasserfreiem DMSO bei einem Überschuss an Kaliumcarbonat (K_2CO_3) oder von Plé et al. mit 1-(3-Chlorpropyl)piperidin in DMF und K_2CO_3 unter Argon-Schutzatmosphäre demonstriert werden.^{78, 79}

Das Edukt **10a** wurde zunächst in Gegenwart einer Base gelöst und für 30 min erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung von 1.5 Äquivalenten 1-(3-Chlorpropyl)piperidiniumchlorid (**54**) hinzu getropft und der Ansatz weiter erhitzt. Dabei fanden verschiedene Basen und Lösemittel Anwendung (Schema 3-17, Methoden A-C). Es entstanden jeweils Produktgemische, wobei es in keinem Fall zu einer vollständigen Umsetzung des Edukts kam. Nach Durchführung von Methode A konnte keines der Produkte isoliert werden. Durch den Einsatz eines zehnfachen Über-

schusses an Kaliumcarbonat in Acetonitril (Schema 3-17, Methode B) entstand nach ^1H -NMR-spektroskopischen Daten ein dialkyliertes Produkt. Die äquimolare Umsetzung von **10a** mit Natriumhydrid und das anschließende Zutropfen einer Lösung von 1-(3-Chlorpropyl)piperidin führte zu einem Produktgemisch, aus dem die gewünschte Struktur **16a** säulenchromatographisch isoliert werden konnte (Schema 3-17). Mittels zweidimensionaler NMR-Methoden (HSQC, HMBC) wurde sichergestellt, dass bei **16a** die Aminoalkylierung in 4'-Position erfolgt ist.



Schema 3-17: Synthese von 2-{4-[3-(1-Piperidinyl)propoxy]anilino}-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on **16a**

Methode A: 12.5 eq K_2CO_3 , DMF, 80 °C

Methode B: 10 eq K_2CO_3 , ACN, Reflux

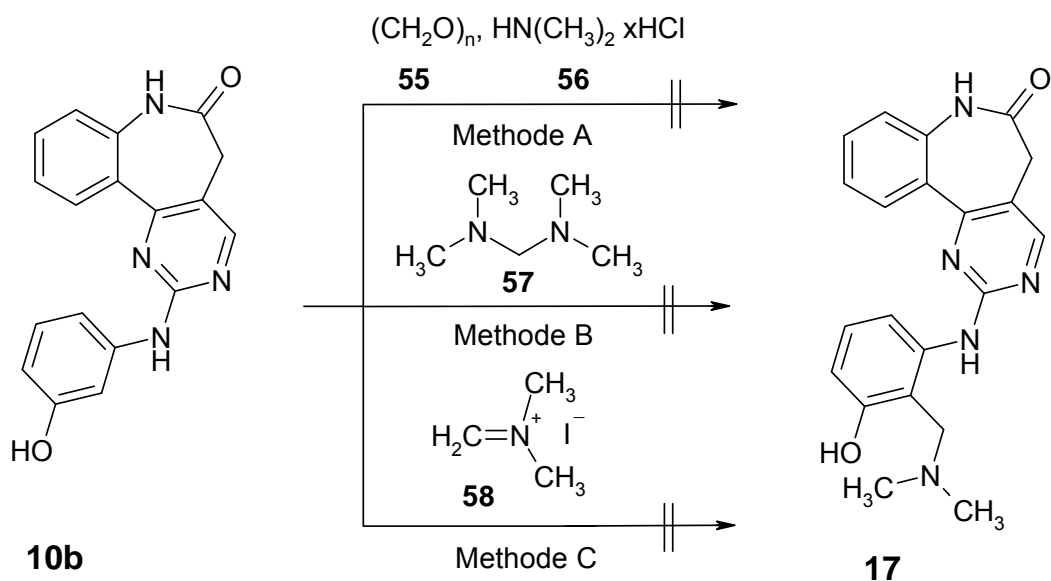
Methode C: 1 eq NaH, DMSO, 60 °C, **54** wurde als freie Base eingesetzt

Methode C ließ sich nicht zur Alkylierung der phenolischen Hydroxylgruppe der analogen Verbindung **10b** übertragen, was vermutlich auf die geringe Löslichkeit dieses Edukts zurückzuführen ist.

Die Darstellung der Zielstruktur **15** wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwirklicht.

3.2.4 Versuche zur Synthese von Phenol-Mannich-Basen

Die Polarität von Phenolderivaten kann ebenfalls durch Aminomethylierung gesteigert und damit ihre Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen erhöht werden.⁸⁰ Ausgangsstruktur sollte dabei das 3'-Hydroxyanilinopyrimidin **10b** sein. Schema 3-18 stellt die angewendeten Methoden dar. **10b** wurde mit äquimolaren Mengen Paraformaldehyd (**55**) und 1.5 Äquivalenten Dimethylamin-Hydrochlorid (**56**) in absolutiertem Ethanol mit katalytischen Mengen konzentrierter Salzsäure zum Rückfluss erhitzt (Schema 3-18, Methode A).⁸¹ Es konnte auch nach langen Reaktionszeiten (> 20 h) keine vollständige Umsetzung des in Ethanol schwer löslichen Edukts erreicht werden. Die erhaltenen Produktgemische wurden säulenchromatographischen Auftrennungen unterworfen, jedoch war keine der Fraktionen als gewünschte Zielstruktur **17** zu identifizieren und zu isolieren. Neben Formaldehyd können auch Aminale und Iminiumsalze als Mannich-Reagentien eingesetzt werden.⁸² **10b** wurde daher zum einen mit einem zwölffachen Überschuss Bis(dimethylamino)methan (**57**) in Dioxan mit katalytischen Mengen konzentrierter Essigsäure bei 100 °C umgesetzt (Schema 3-18, Methode B).⁸³ Zum anderen wurde die Reaktion mit äquimolaren Mengen *N*-Methyl-*N*-methylenmethaniminium-Iodid (Eschenmoser-Salz, **58**) versucht. Nach einer Vorschrift von Pochini et al. wurde das Phenol **10b** mit Eschenmoser-Salz in Gegenwart von Kaliumcarbonat in Toluol gerührt (Schema 3-18, Methode C).⁸⁴ Das gewünschte 2-{2-[(Dimethylamino)methyl]-3-hydroxyanilino}-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**17**) konnte mit keiner der beschriebenen Methoden dargestellt werden. Neben der schlechten Löslichkeit des Edukts **10b** liegt der Grund hierfür auch wieder in der Bildung von Produktgemischen. So können neben **17** auch 2',4'-diaminomethylierte Derivate entstehen, die sich von der gewünschten Zielstruktur nur schwer abtrennen lassen.



Schema 3-18: Versuche zur Darstellung der Phenol-Mannich-Base **17**

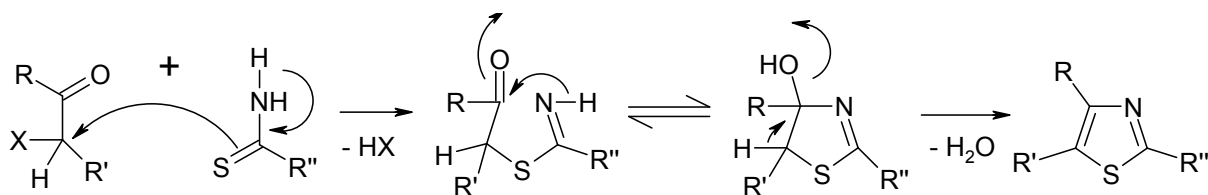
Methode A: Paraformaldehyd (**55**), Dimethylamin-Hydrochlorid (**56**), abs. Ethanol, konz. HCl, Reflux

Methode B: Bis(dimethylamino)methan (**57**), CH₃COOH, Dioxan, 100 °C

Methode C: *N*-Methyl-*N*-methylenmethaniminium-Iodid (**58**), K₂CO₃, Toluol, N₂, RT → 60 °C

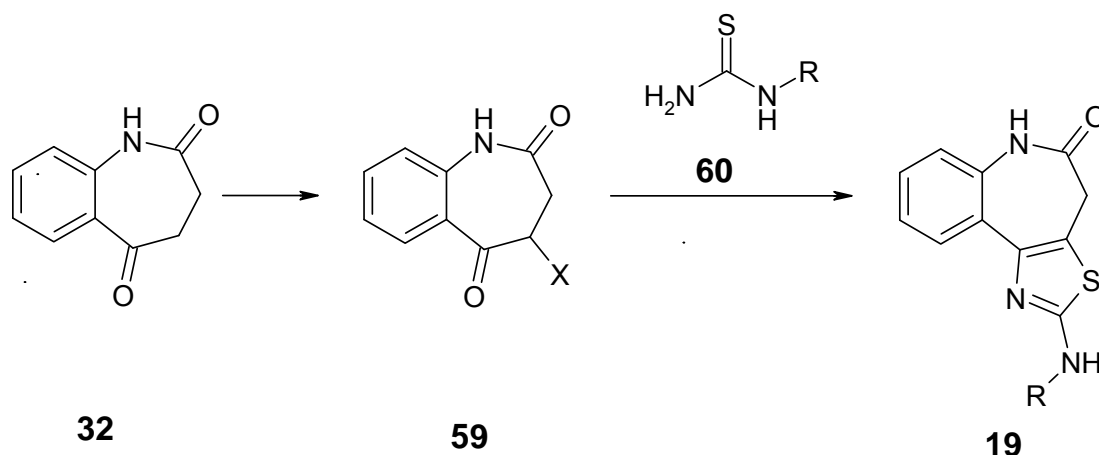
3.2.5 Versuche zur Synthese von [1,3]Thiazolo[5,4-d][1]benzazepin-5-onen

Als bioisostere Verbindungen zu den Anilinopyrimidinen **10** sollten im Rahmen dieser Arbeit [1,3]Thiazolo[5,4-*d*][1]benzazepin-5-one des Typs **19** erschlossen werden. Thiazolderivate entstehen nach der Hantzschschen Thiazolsynthese durch Kondensation von α -Halogencarbonylverbindungen mit Thioamiden (Schema 3-19).⁸⁵



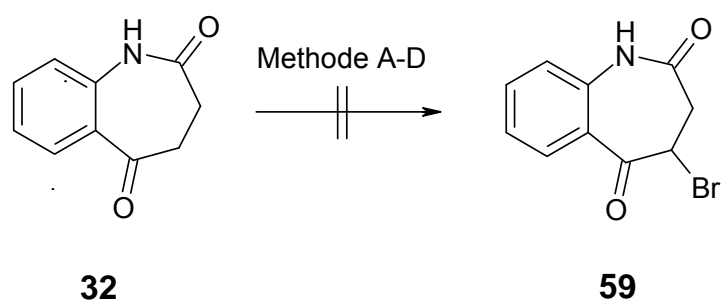
Schema 3-19: Hantzsche Thiazolsynthese

Zur Darstellung der gewünschten 2-Anilinothiazole **19** sollte zunächst 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**32**) in Position 4 halogeniert und anschließend mit Thioharnstoffderivaten **60** umgesetzt werden (Schema 3-20).⁸⁶



Schema 3-20: Geplante Darstellung von [1,3]Thiazolo[5,4-*d*][1]benzazepin-5-onen **19**

Um zu der α -halogenierten Verbindung **59** zu gelangen, wurde das Benzazepindion **32** nach einer Vorschrift zur Darstellung von Phenacylbromiden mit Brom als Halogenierungsagens in Eisessig und Bromwasserstoff als Katalysator unter Wasserkühlung, also bei ca. 17 °C, umgesetzt (Schema 3-21, Methode A).⁸⁷ Anschließend wurde der Ansatz in Eiswasser gegossen. Der dabei entstehende Niederschlag konnte isoliert werden. Nach den DC-Ergebnissen zu urteilen, bestand er aus einem Produktgemisch. Eine Auftrennung des Gemischs gelang nicht.



Schema 3-21: Versuche zur α -Halogenierung von **32**

Methode A: Br₂, HBr, CH₃COOH, 17 °C

Methode B: NBS, Amberlyst-15[®], Ethylacetat, RT

Methode C: Br₂, HCCl₃, 0 °C

Methode D: Br₂, CCl₄, 0 °C

Um die gewünschte Verbindung **59** zu erhalten, wurde außerdem versucht, **32** nach Meshram et al. mit *N*-Bromsuccinimid in Ethylacetat bei Raumtemperatur in Gegenwart von Amberlyst-15[®], einem sauren Ionenaustauscher-Harz als Katalysator, umzusetzen (Schema 3-21, Methode B).⁸⁸ Nach Abtrennung des Katalysators konnte durch Aufkonzentrierung der Ethylacetat-Phase ein gelber Feststoff isoliert werden. Die Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums ließ jedoch darauf schließen, dass nicht die α -bromierte Verbindung **59** entstanden war, sondern das α,β -ungesättigte 1*H*-1-Benzazepin-2,5-dion **61** (Abb. 3-4). Ein Vergleich der NMR-Daten und des Schmelzpunktes der isolierten Verbindung **61** mit Literaturwerten bestätigte diese Vermutung.⁸⁹

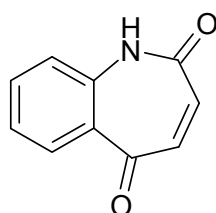
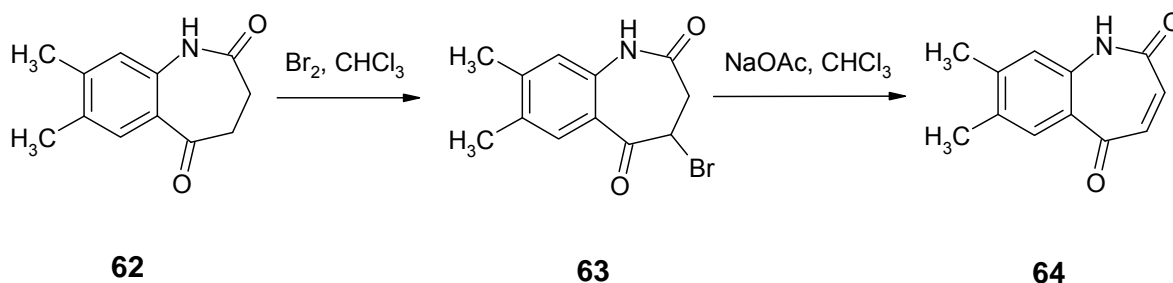
**61**

Abbildung 3-4: α,β -ungesättigtes 1*H*-1-Benzazepin-2,5-dion **61**

Rees gelang die Darstellung der α -bromierten, strukturell sehr ähnlichen Verbindung **63** durch Bromierung mit Br₂ und Chloroform als Lösemittel sowie die Isolierung dieser Struktur. Durch Behandlung von **63** mit Natriumacetat in Chloroform entstand die α,β -ungesättigte Verbindung **64**.⁹⁰ (Schema 3-22)

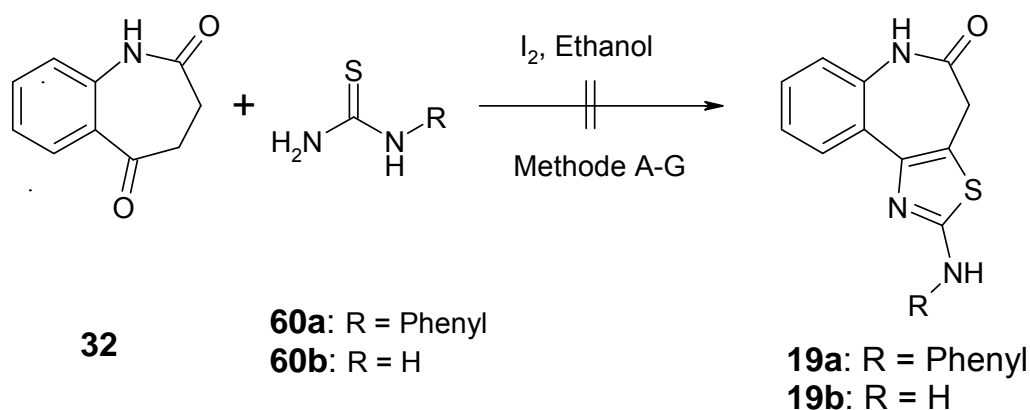


Schema 3-22: Bromierung des Ketolactams **62** nach Rees et al.⁹⁰

Der Versuch einer Übertragung dieser Reaktionsbedingungen zur α -Bromierung von **32** gelang nicht. Es entstand ein Produktgemisch, wobei der R_f -Wert des Hauptflecks, der während der DC-Kontrolle ermittelt wurde, dem der ungesättigten Verbindung **61** entsprach. Die Auftrennung des Produktgemischs mittels Säulenchromatographie gelang unter den gewählten Bedingungen nicht (Schema 3-21, Methode C).

Der Austausch von Chloroform gegen Tetrachlorkohlenstoff führte zur Bildung eines gelben Feststoffs, welcher sich allerdings nach Abtrennung des Lösemittels als nicht stabil erwies. An der Luft zersetzte sich der Stoff zu einem Öl, welches wiederum ein Produktgemisch darstellte. (Schema 3-21, Methode D.) Auch hier entsprach der Hauptfleck der DC dem der ungesättigten Verbindung **61**. Ohne weitere Aufreinigung ließ sich das Gemisch nicht mit Thioharnstoff (**60b**) ($R = H$) umsetzen.

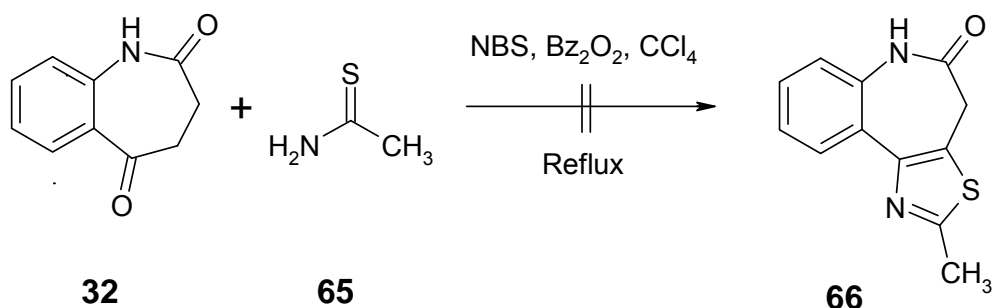
Da es unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht gelang, das α -bromierte Benzazepindion **59** zu synthetisieren bzw. zu isolieren, wurde in verschiedenen Eintopfsynthesen versucht, das Edukt **32** über eine halogenierte Zwischenstufe mit Thioharnstoff-Derivaten direkt zu der Zielstruktur **19** weiter reagieren zu lassen (Schema 3-23).



Schema 3-23: Versuch einer Eintopf-Reaktion zur Darstellung der 2-Aminothiazole **19** nach Göblyös et al.⁹¹

Nach einer Vorschrift von Göblyös et al. wurde **32** mit elementarem Iod und Thioharnstoff in einer Eintopfreaktion umgesetzt (Schema 3-23).⁹¹ Es wurden verschiedene Thioharnstoffderivate in unterschiedlichen Mengen eingesetzt. Darüber hinaus

wurden die Reaktionstemperatur und -zeit variiert. Die angewendeten Methoden A-G sind in Kapitel 7.2, Tabelle 7-1 beschrieben. Das gewünschte Produkt **19** konnte in keinem Fall isoliert werden.



Schema 3-24: Versuch einer Darstellung von 2-Methyl-4,6-dihydro-5*H*-[1,3]thiazolo[5,4-*d*][1]benzazepin-5-on (**66**)

In einer weiteren Eintopfsynthese wurde nach Padmavathi et al. versucht, das Thiazol-Derivat **66** durch Umsetzung des Edukts **32** mit Thioacetamid (**65**), N-Bromsuccinimid und Benzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff unter Refluxbedingungen herzustellen (Schema 3-24).⁹² Auch dieser Versuch blieb erfolglos.

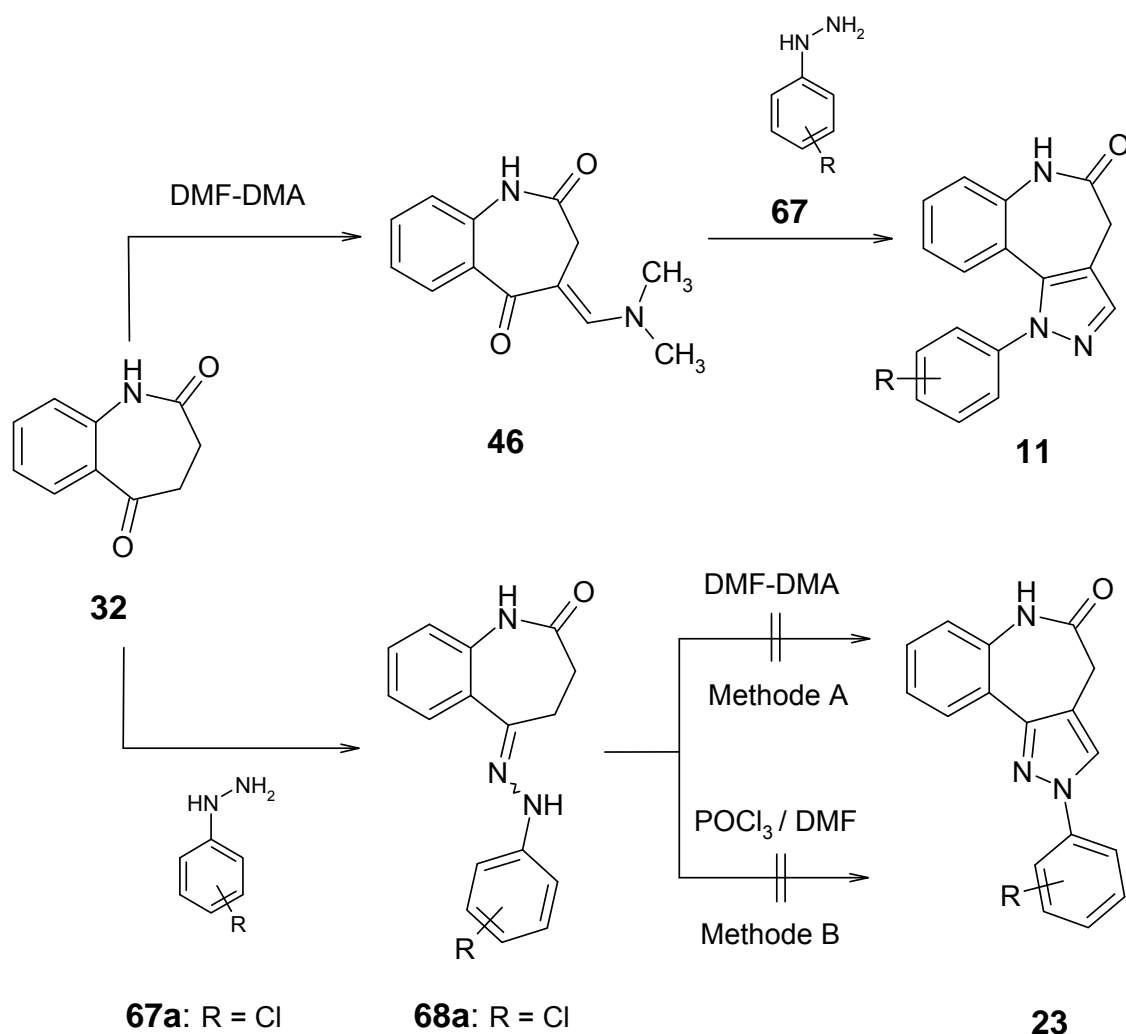
Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle Versuche zur Herstellung von [1,3]Thiazolo[5,4][1]benzazepin-5-onen nicht erfolgreich waren. Anscheinend ist das α -bromierte Intermediat **59** so instabil, dass es sich bei allen Variationen der Hantzsch-Thiazol-Synthese, die hier erprobt wurden, zersetzte, bevor es zu einer Kondensation mit dem Thioharnstoff kam.

3.3 Synthese der 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one und azaanaloger Verbindungen

Kohfeld synthetisierte die 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **11** in Anlehnung an Schenone et al.⁹³ und Olivera et al.⁹⁴ Das Enaminon **46** wurde dazu mit Phenylhydrazinhydrochloriden **67** (1.5 Äquivalente) in Eisessig bei 70 °C unter Zusatz von Natriumacetat (1.5 Äquivalente) umgesetzt (Schema 3-25). Kohfeld konnte mittels Röntgenkristallstruktur-Analyse belegen, dass dabei 1,4,5-

substituierte Pyrazole des Typs **11** entstehen. Der Reaktionsmechanismus verläuft dabei über einen initialen nucleophilen Angriff des Hydrazins **67** an der C-C-Doppelbindung des Enaminons **46**, wie die Isolierung der entsprechenden Zwischenstufe bestätigte.⁶¹

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der beschriebenen Methode die Enaminone **47**, **48** und **49** mit Phenylhydrazinhydrochloriden **67** umgesetzt. Es sollten dabei die analogen Verbindungen zu den Pyrazol-Derivaten **11** dargestellt werden, die bei Kohfeld die beste antiproliferative Aktivität beim *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) gezeigt hatten.⁶¹



Schema 3-25: Darstellung von Pyrazol-Stellungsisomeren

Die Abbildung 3-5 gibt einen Überblick über die synthetisierten 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrido[3,2-*b*]azepin-5(1*H*)-one **20a-b**, das 1-(4-Methoxy-phenyl)-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrido[4,3-*b*]azepin-5(1*H*)-on (**21a**) sowie die 8-Methoxyderivate **22a-e**. Die Umsetzung von 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) mit 3,5-Dichlorphenylhydrazinhydrochlorid zu **21b** gelang nicht. Bei **21** handelt es sich um ein neuartiges heterozyklisches System.

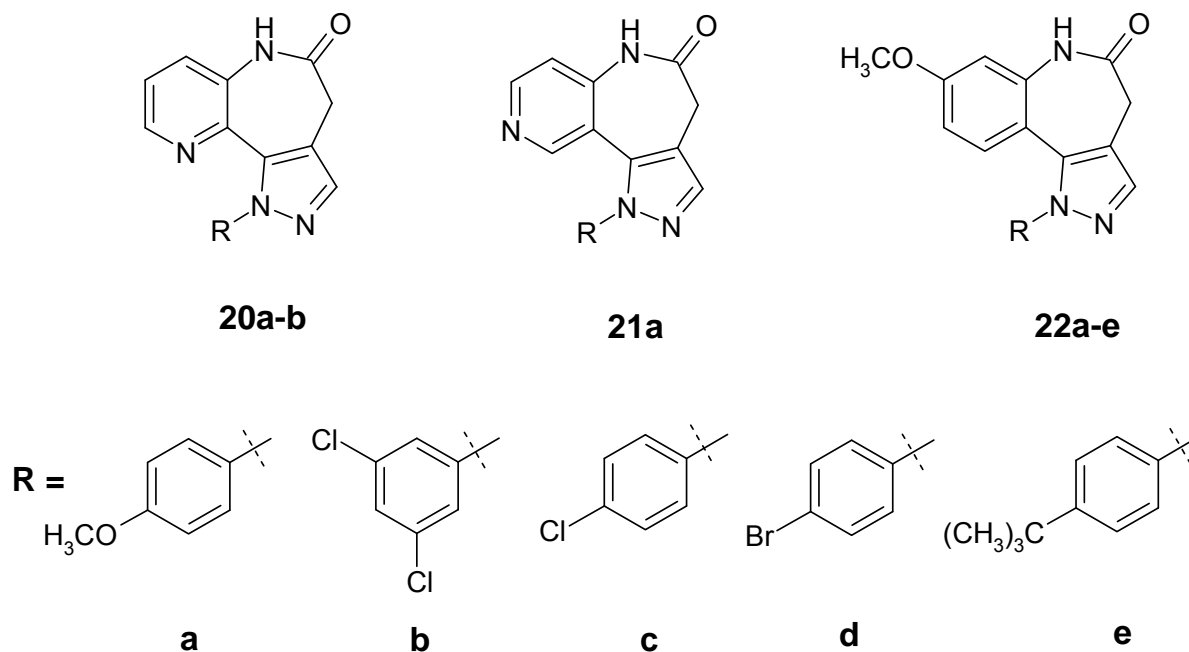
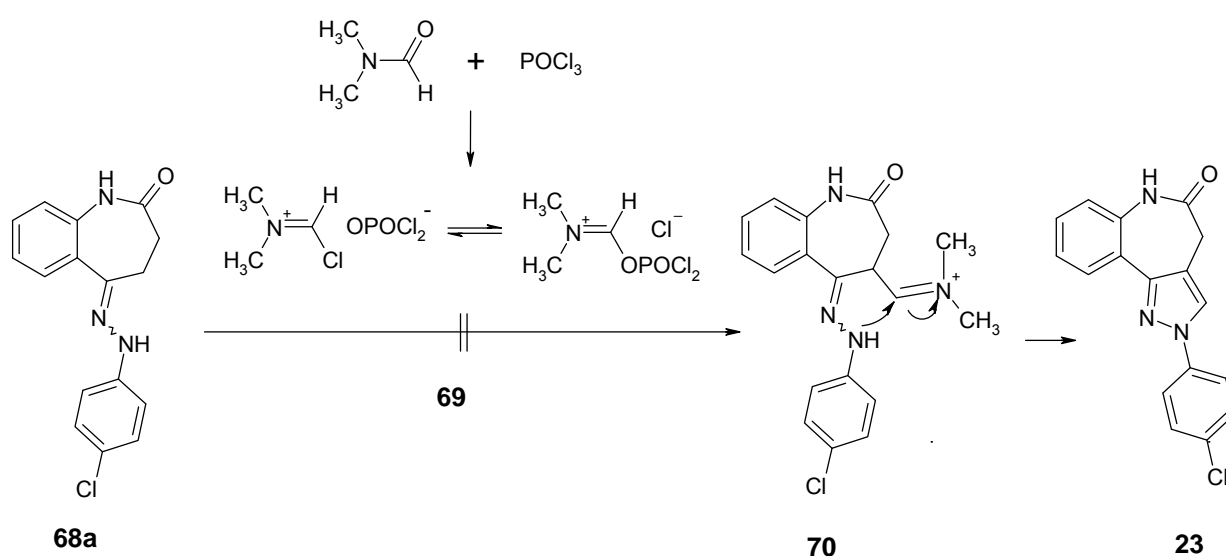


Abbildung 3-5: Synthetisierte Pyrazole **20a-b**, **21a**, **22a-e**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Darstellung von Pyrazol-Stellungsisomeren des Typs **23** (Schema 3-25). Al-Saleh et al. beschreiben die Synthese von 1,3,4-substituierten Pyrazolen durch Reaktion von Hydrazonen mit DMF-DMA.⁹⁵ Diese Vorschrift konnte von Kohfeld jedoch nicht erfolgreich auf Hydrazone des Typs **68** übertragen werden (Schema 3-25, Methode A).⁶¹

Als weitere Möglichkeit zur Darstellung von 1,3,4-substituierten Pyrazolen wird in der Literatur die Umsetzung von Hydrazonen mit Phosphorylchlorid (POCl_3) und DMF in einer Vilsmeier-Haack-Reaktion beschrieben. POCl_3 bildet mit DMF ein Iminiumsalz, den sog. Vilsmeier-Komplex **69**. Dieses Elektrophil sollte dann in einer Substitutionsreaktion zu einem weiteren Iminiumsalz **70** reagieren, worauf der Ringschluss zum Pyrazol **23** erfolgen sollte (Schema 3-26).^{96, 97, 98, 99}

Zunächst wurde das 5-[(4-Chlorphenyl)hydrazono]-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**68a**) synthetisiert. Nach einer Vorschrift von Sivaprasad et al.⁹⁸ wurde das 4'-Chlorhydrazon **68a** in DMF gelöst und im Eisbad gerührt. 6 bis 8 Äquivalente POCl₃ wurden zum einen direkt über einen Zeitraum von 30 min hinzuge tropft. Bei dieser Methode kann die Lactam-Funktion mit POCl₃ zu Iminchloriden reagieren, die sich im Nachhinein wieder hydrolisieren lassen. Zum anderen wurde POCl₃ zunächst in DMF zur Bildung des Vilsmeier-Komplexes **69** gerührt und anschließend langsam zum Edukt hinzuge tropft. Das Edukt setzte sich in beiden Fällen zu Produktgemischen um, aus denen jedoch keine Bestandteile isoliert und identifiziert werden konnten.

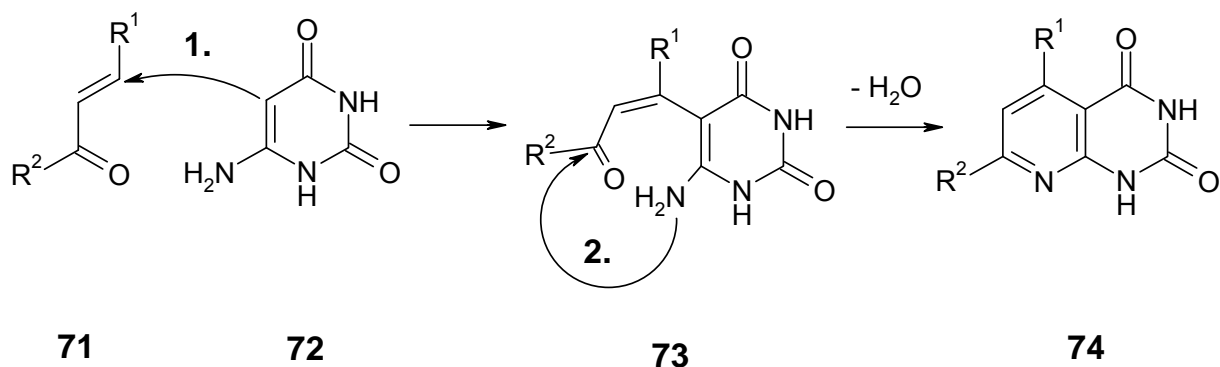


Schema 3-26: Vilsmeier-Haack-Synthese

3.4 Synthese der 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione und azaanaloger Derivate

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinone werden in der Literatur als Bestandteile von antiproliferativen und kinaseinhibitorischen Verbindungen beschrieben.¹⁰⁰ Dieses Strukturelement sollte daher mit 1-Benzazepin-2-onen zu den neuartigen, *d*-anellierten Heterozyklen **24-27a-b** verknüpft werden.

Pyridopyrimidine können durch Kondensationsreaktionen von 6-Aminopyrimidinen (z. B. **72**) und 1,3-Biselektrophilen **71** dargestellt werden (Schema 3-27). Bei letzteren handelt es sich beispielsweise um 1,3-Dicarbonylverbindungen, α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen oder Enaminone.¹⁰¹



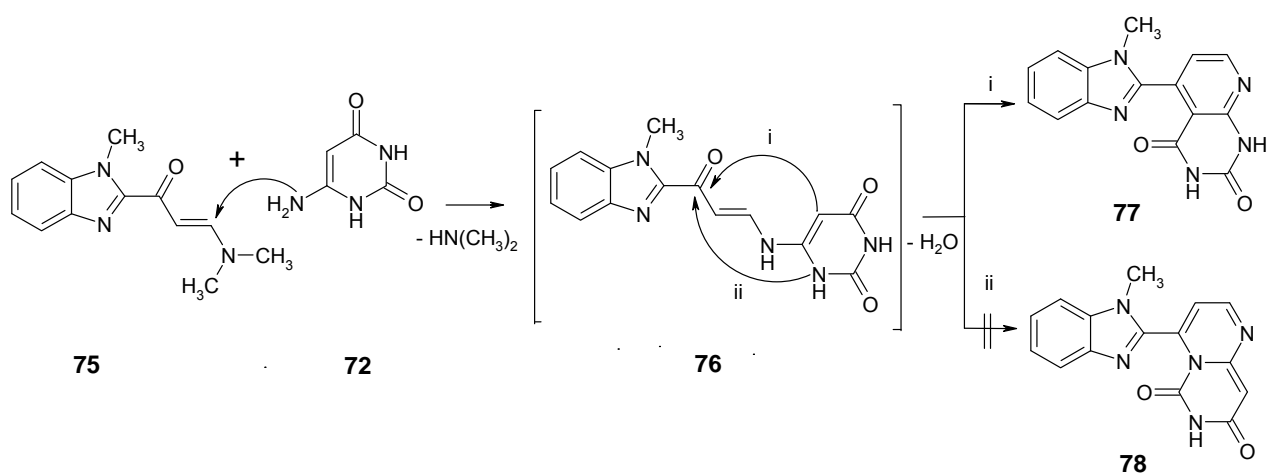
Schema 3-27: Reaktion von 1,3-Biselektrophilen **71** mit dem Enamin 6-Aminouracil (**72**) zu Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinen **74**

Substituierte 6-Aminopyrimidine weisen mehrere reaktive Zentren auf. In der Literatur wird überwiegend das C5-Enamin-Kohlenstoffatom des Aminopyrimidins als nucleophilste Position beschrieben. Initial kommt es daher durch nucleophile, Michael-artige Addition dieses C5-Kohlenstoffatoms an das elektrophilere Zentrum von **71** zur Bildung der Zwischenstufe **73**. Es folgt der Ringschluss durch Reaktion der exozyklischen Aminogruppe von **72** mit dem zweiten elektrophilen Kohlenstoffatom des Biselektrophils **71**. (Schema 3-27)^{101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108}

Dieser Reaktionstyp wird auch als Michael-Addition-Zyklodehydratation bezeichnet.¹⁰⁴ Der beschriebene Reaktionsmechanismus konnte durch Bagley et al.¹⁰⁴ und Troschütz et al.¹⁰⁵ durch Isolierung des jeweiligen Zwischenprodukts **73** und anschließendem Ringschluss zu **74** belegt werden.

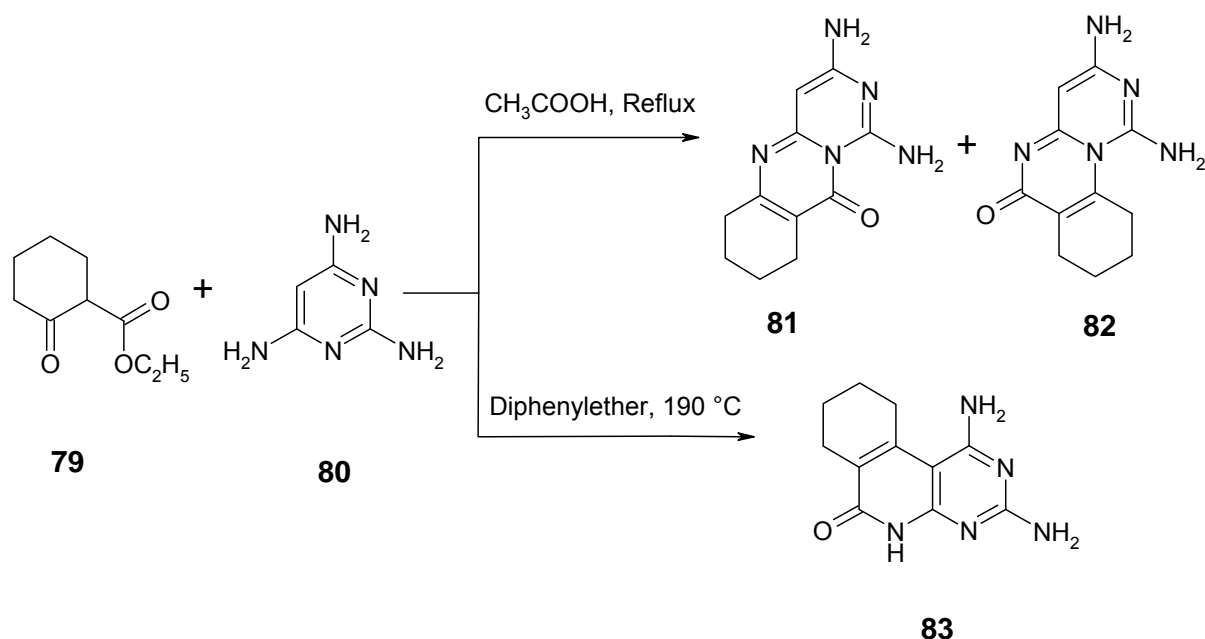
Shaaban et al.¹⁰⁹ stellen Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine dar, indem sie 6-Aminouracil (**72**) mit dem Enaminon **75** durch Refluxieren in Eisessig umsetzen. Entgegen dem anfänglich beschriebenen Mechanismus wird ein initialer Angriff der exozyklischen Aminogruppe von **72** am β -Kohlenstoffatom des Enaminons **75** unter Bildung des

nicht isolierten Zwischenprodukts **76** formuliert. Der zweite nucleophile Angriff findet am Enaminon-Carbonyl-Kohlenstoffatom statt und soll entweder vom C5-Kohlenstoffatom (Schema 3-28, i) oder vom N1-Stickstoffatom des Uracils **72** (Schema 3-28, ii) ausgehen. So kann es zur Bildung der Strukturisomere **77** oder **78** kommen. Gemäß den Angaben in der Literatur zeigt das isolierte Produkt im ^1H -NMR-Spektrum zwei Singulets, und zwar bei $\delta = 11.51$ und 11.85 ppm, die nach H/D-Tausch mit D_2O gelöscht werden. Diese Signale wurden von den Autoren den beiden NH-Gruppen des Produkts **77** zugeordnet. Die Bildung der Verbindung **78** wurde somit ausgeschlossen.¹⁰⁹ (Schema 3-28)



Schema 3-28: Umsetzung des Enaminons **75** mit 6-Aminouracil (**72**)¹⁰⁹

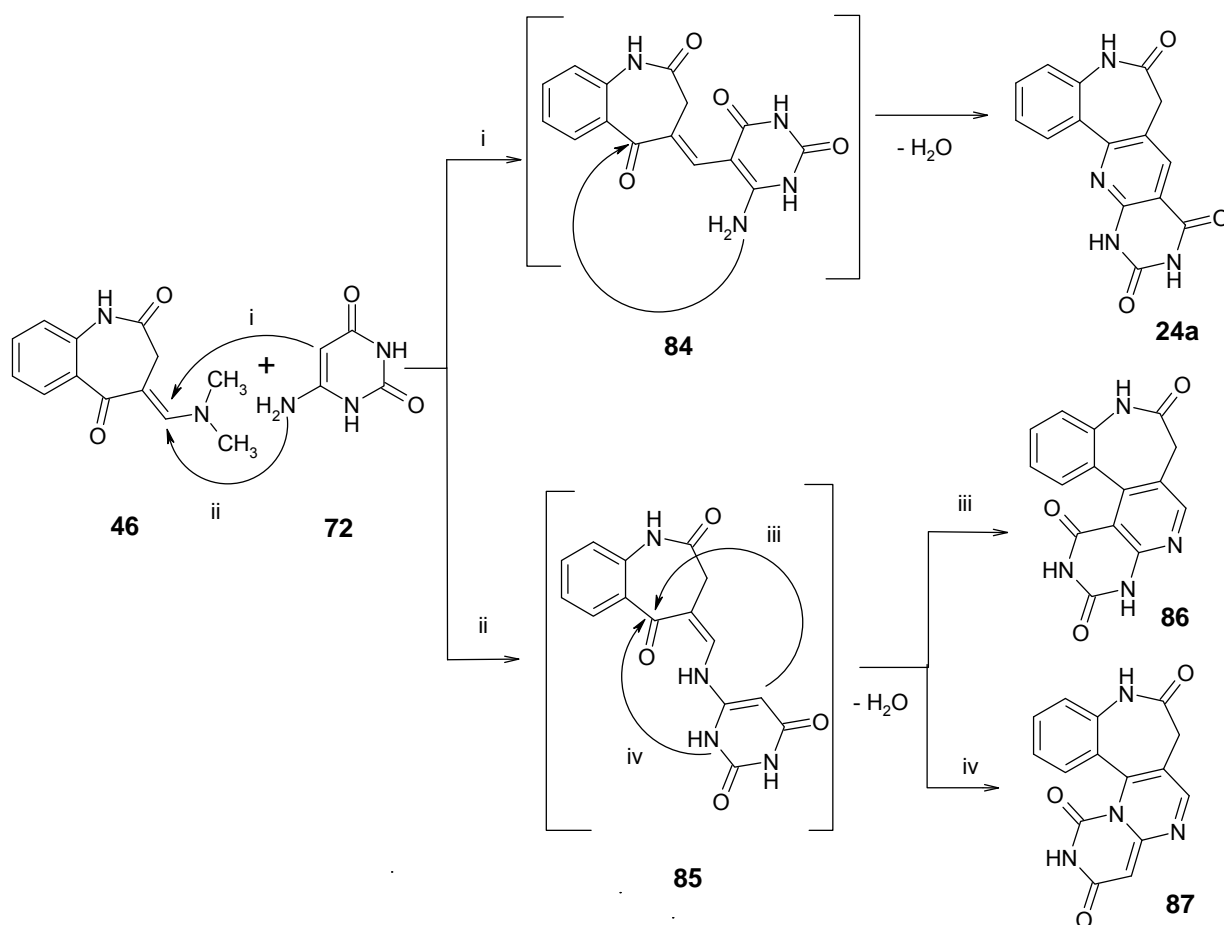
Während Shabaan et al. die mögliche Entstehung weiterer Strukturisomere nicht diskutieren, beobachten Vasudevan und Mitarbeiter die Abhängigkeit der Reaktivität von 6-Aminopyrimidinen von den jeweiligen Reaktionsbedingungen.¹¹⁰ Bei der Umsetzung von 2,4,6-Triaminopyrimidin (**80**) mit dem β -Ketoester **79** in refluxierender Essigsäure kommt es zum nucleophilen Angriff der 6-Aminogruppe und dem N1-Ringstickstoff von **80** mit den elektrophilen Zentren von **79** unter Bildung eines 1:1-Gemischs von **81** und **82**. In siedendem Diphenylether dagegen reagieren das C5-Kohlenstoff und die 6-Aminogruppe von **80** mit dem β -Ketoester **79** zu **83**.¹¹⁰ (Schema 3-29)



Schema 3-29: Umsetzung von 6-Aminopyrimidinen mit Biselektrophilen nach Vasudevan et al.¹¹⁰

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden die Enaminone **46-49** nach den von Shabaan und Mitarbeitern beschriebenen Reaktionsbedingungen mit 6-Aminouracilen (z. B. **72**) in refluxierender Essigsäure zu neuartigen Heterozyklen umgesetzt.¹⁰⁹ Die Entstehung möglicher Strukturisomere wird im Folgenden diskutiert und in Schema 3-30 am Beispiel des 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**46**) dargestellt.

Berechnungen der relativen Elektronendichte-Verteilung mit dem Programm HyperChem weisen dem C5-Kohlenstoffatom des 6-Aminouracils (**72**) eine stark negative Partialladung zu und erklären damit dessen nucleophile Eigenschaften (Abb. 3-6). Diese Ergebnisse stimmen mit Berechnungen von Troschütz und Mitarbeitern überein.¹⁰⁵ Ein initialer nucleophiler Angriff des Uracil-C5-Atoms am β -Kohlenstoffatom des Enaminons **46** führt zunächst zur Bildung der Zwischenstufe **84**. Der Ringschluss zum Produkt **24a** findet zwischen der exozyklischen Aminogruppe und der Ketogruppe von **84** statt. (Schema 3-30, i)



Schema 3-30: Umsetzung von Enaminon **46** mit 6-Aminouracil (**72**)

Demgegenüber würde in Analogie zum von Shaaban et al. postulierten Reaktionsmechanismus nach nucleophilem Angriff der 6-Aminogruppe von **72** das Zwischenprodukt **85** entstehen (Schema 3-30, ii).¹⁰⁹ Der Ringschluss kann nun über einen Angriff an der Ketogruppe erfolgen, und zwar entweder ausgehend vom C5-Uracil-Kohlenstoffatom (Schema 3-30, iii) oder vom N1-Stickstoffatom (Schema 3-30, iv). Im ersten Fall würde Produkt **86**, im zweiten Fall Produkt **87** entstehen.

Das tatsächlich isolierte Produkt zeigt im ¹H-NMR-Spektrum in DMSO-*d*₆ drei Singulettis bei δ = 10.27, 11.47 und 11.73 ppm (Intensität jeweils 1 Proton), welche auf Zugabe von D₂O verschwinden (Abb. 3-7). Dies weist auf drei Protonen an Heteroatomen hin. Darüber hinaus enthält die isolierte Verbindung laut ¹³C-Dept-Spektrum ein sekundäres, 5 tertiäre und 9 quartäre Kohlenstoffatome (Abb. 3-9). Laut NMR-Daten kann es sich bei dem isolierten Produkt demnach nicht um die Struktur **87** handeln, welche im ¹H-NMR nur zwei austauschbare Protonen und im

^{13}C -Dept-Spektrum neben einem sekundären 6 tertiäre und 8 quartäre Kohlenstoffatome zeigen würde.

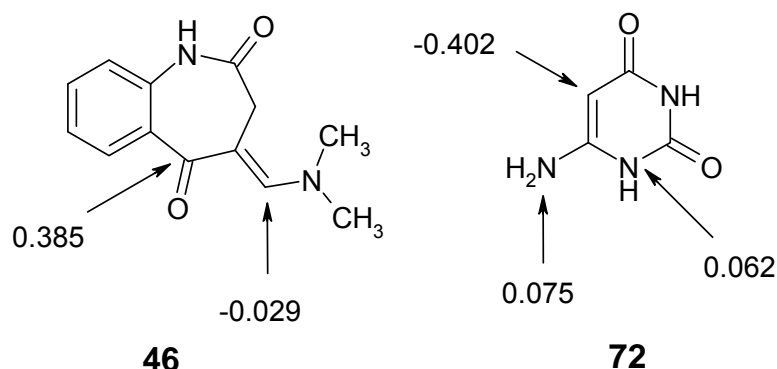
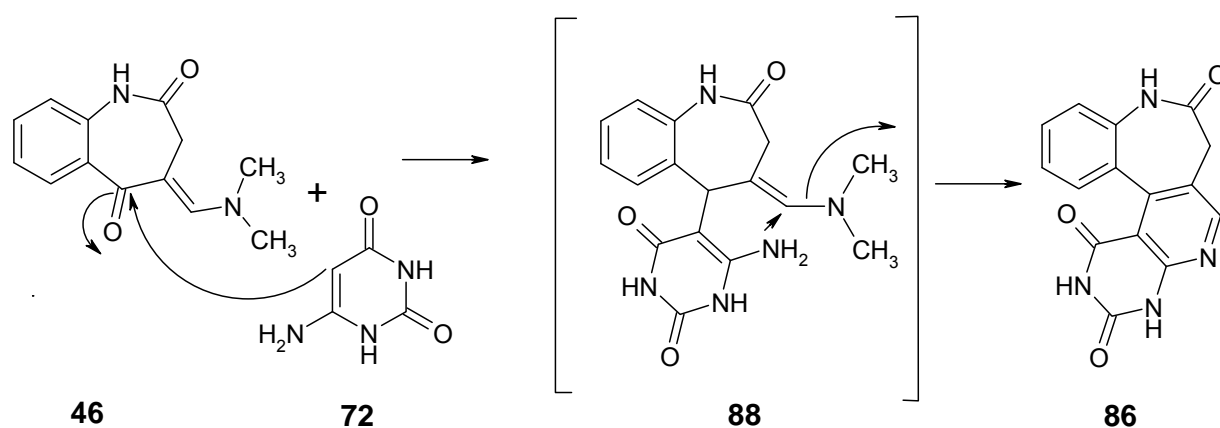


Abbildung 3-6: Elektronendichte-Verteilung der Edukte **46** und **72**

Die Berechnung wurde von Dr. Lutz Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, durchgeführt (Programm HyperChem (release 8.0.4), Geometrieoptimierung mit dem semiempirischen Modul PM3, Abbruchkriterium: RMS-gradient 0.1 kcal/(Å·mol), Partialladungen bestimmt mit einer Mulliken Populationsanalyse).

Im Rahmen der hier diskutierten Reaktion ist auch denkbar, dass sich das Uracil-Kohlenstoffatom an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Enaminons anlagert, wodurch ein mögliches Zwischenprodukt **88** entstehen könnte. Der anschließende Ringschluss würde dann über den Angriff der Aminogruppe an die Enaminon-Doppelbindung erfolgen. Hieraus würde ebenfalls das Produkt **86** entstehen. (Schema 3-31)

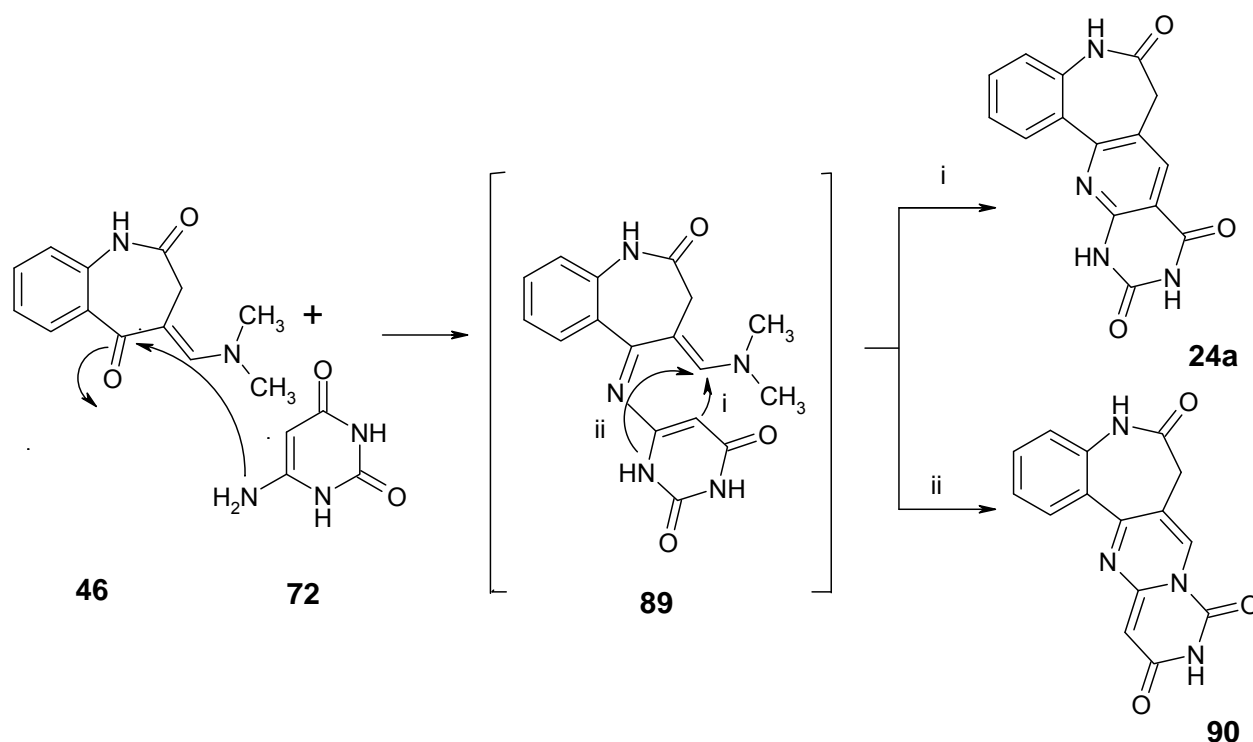
Der in Schema 3-31 dargestellte Reaktionsweg ist im Vergleich zu anderen Reaktionen von Enaminonen des Typs **46** der weniger wahrscheinliche. Wie in Kapitel 3.3 erwähnt, erfolgt beispielsweise die Darstellung von Arylpyrazolo[1]benzazepin-5-onen **11** über die initiale nucleophile Addition von Phenylhydrazinen an die Doppelbindung des Dimethylaminomethylidens und nicht an das Carbonyl-Kohlenstoffatom in Position 5 des Enaminons **46**. Dies konnte Kohfeld durch Isolierung des entsprechenden Zwischenprodukts und anschließendem Ringschluss zu **11** belegen.⁶¹



Schema 3-31: Mögliche Entstehung des Isomers **86**

Da auch sterische Faktoren und die Qualität der Abgangsgruppe von Bedeutung sind, steht dies nicht im Widerspruch zu der berechneten Elektronendichte-Verteilung des Enaminons **46**. Ein mögliches Produkt **86** würde demnach vermutlich über den in Schema 3-30 dargestellten Weg entstehen.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass nach der Argumentationskette von Shaaban et al. auch ein Zwischenprodukt **89** denkbar wäre, welches durch Anlagerung der Uracil-Aminogruppe an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Enaminons **46** zustande käme. Das Produkt **24a** würde demnach aus der Addition des Uracil-C5 an die Doppelbindung des Dimethylaminomethylidens hervorgehen (Schema 3-32, i). Von dem Zwischenprodukt **89** ausgehend wäre auch die Bildung eines Produkts **90** möglich, und zwar über einen Angriff vom Uracil-N1 an die Enaminon-Doppelbindung (Schema 3-32, ii).



Schema 3-32: Denkbare Bildung der Isomere **24a** und **90**

Der in Schema 3-32 dargestellte Mechanismus wird für wenig wahrscheinlich gehalten, da die Reaktivität von 6-Aminouracil (**72**) einem initialen Angriff der Aminogruppe widerspricht. Darüber hinaus kann das Konstitutionsisomer **90** nach den bereits beschriebenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten des tatsächlich isolierten Produkts nicht vorliegen, aus den gleichen Gründen, die auch zum Ausschluss von Derivat **87** führten.

Es galt nun zu untersuchen, ob es sich bei der Verbindung um das Konstitutionsisomer **24a** oder **86** handelte. Wie im Folgenden dargestellt, ergab die Auswertung der Kernresonanzspektren eine eindeutige Zuordnung zur erstgenannten Struktur **24a**.

Da für beide Derivate nahezu identische eindimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erwartet wurden, erfolgte die Strukturaufklärung mittels zweidimensionaler NMR-Techniken. Dabei wurde die H,C-Korrelation via ^1J -Kopplung (C,H) mittels *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) dargestellt und die H,C-Korrelation via ^nJ -Kopplung (C,H) mittels *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC), wobei die Kopplung über 2 bis 4 Bindungen hinweg dargestellt wird ($n = 2-4$). Außerdem

wurden die tatsächlich gemessenen NMR-Signale mit Voraussagen durch auf ^{13}C -Datenbanken beruhenden Computerprogrammen (ACD/CNMR Predictor, ACD/Labs 7.00 release, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada, 2003; ChemBioDraw Ultra 11.0, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, 2007) verglichen.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind alle Signale eindeutig den Protonen der Verbindung **24a** bzw. **86** zuzuordnen (Abb. 3-7), eine Unterscheidung zwischen den Konstitutionsisomeren ist jedoch nicht möglich. Das Auftreten eines scharfen Singulett bei 3.54 ppm mit einer Intensität von 2 Protonen für die azepinische CH_2 -Gruppe spricht jedoch für das Vorliegen von Verbindung **24a**. Für das Isomer **24a** wird eine schnelle Ringinversion des Azepinrings erwartet, durch die die beiden Methylenprotonen magnetisch äquivalent werden und deshalb ein scharfes Singulett verursachen. Verbindung **86** weist demgegenüber ein helikales Strukturgerüst auf, für das die Ringinversion stark eingeschränkt sein müsste. Die Ringmethylenprotonen von ähnlichen Strukturen zeigen im ^1H -NMR-Spektrum zwei diskrete Dubletts.¹¹¹ Dies wird am Beispiel der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *d*-anellierten Heterozyklen in Kapitel 3.5 diskutiert.

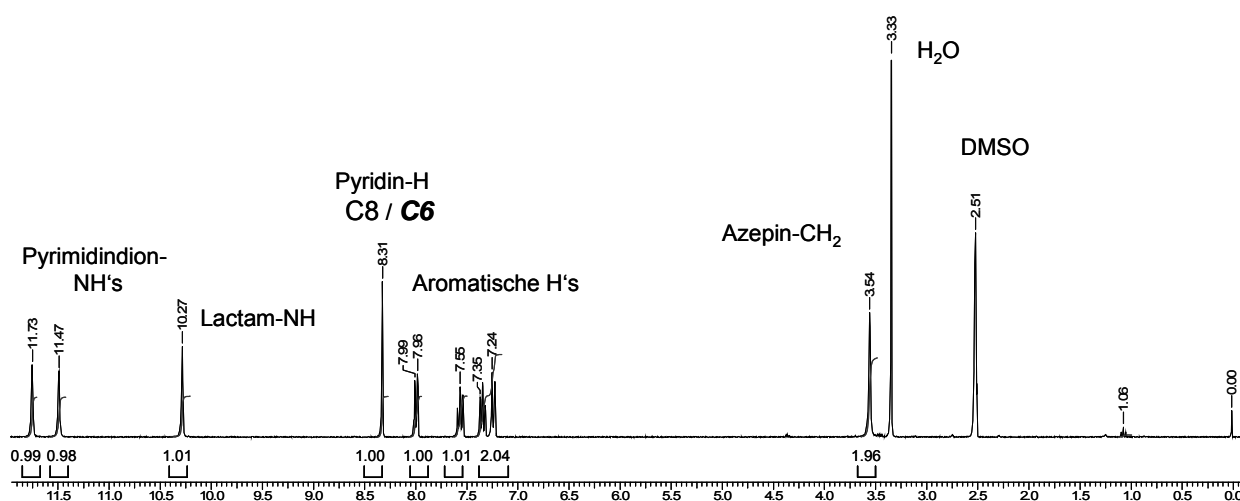


Abbildung 3-7: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Verbindung **24a**

Eine theoretische Zuordnung zu der ausgeschlossenen alternativen Struktur **86** erfolgt durch fettkursiv gedruckte Ziffern.

Abbildung 3-8 zeigt die tertiären und quartären Kohlenstoffatome des zu untersuchenden Isomers. Nach dem ^{13}C -Dept-Spektrum handelt es sich bei den Signalen bei $\delta = 121.26, 123.12, 130.15, 130.30$ und 135.78 ppm um tertiäre Kohlenstoffatome (Abb. 3-9).

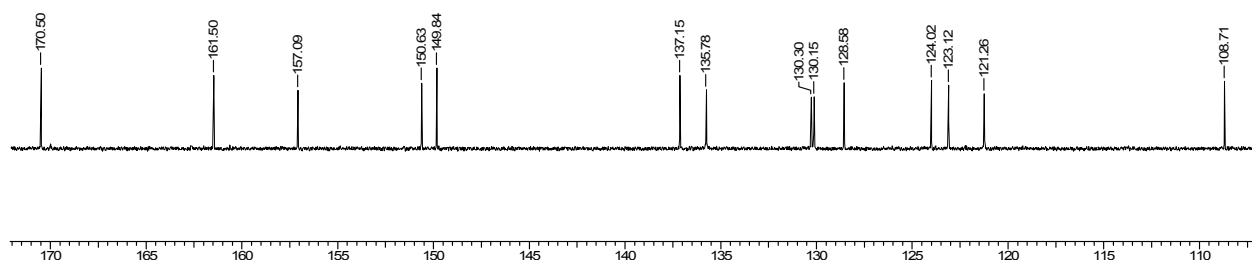


Abbildung 3-8: ^{13}C -NMR-Spektrum der isolierten Verbindung **24a** (105-175 ppm)

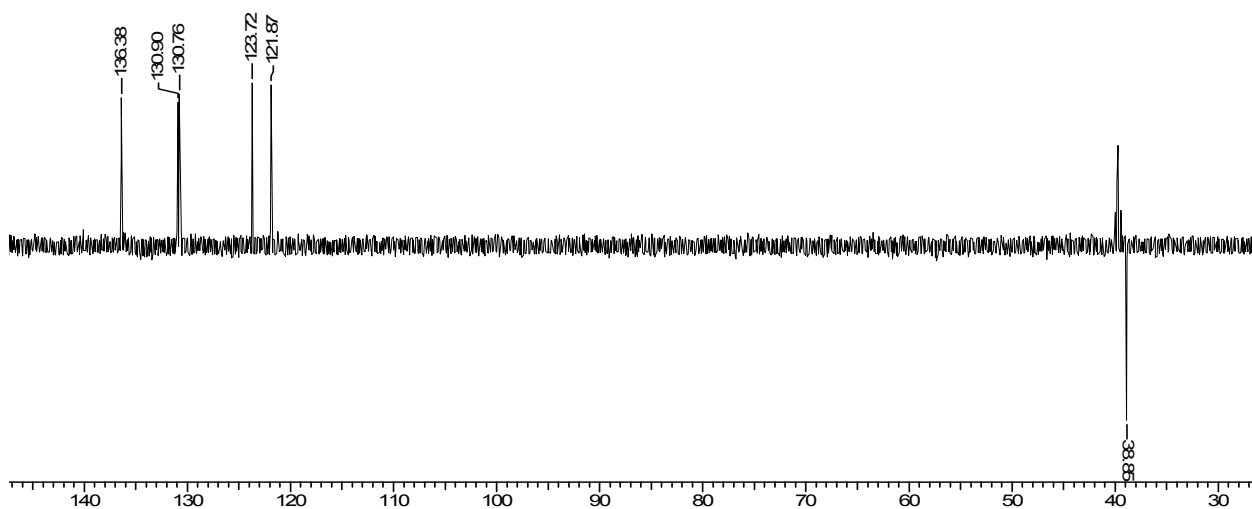


Abbildung 3-9: ^{13}C -Dept-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung **24a**
(25-145 ppm)

Eine genaue Zuordnung der tertiären Kohlenstoffatome ergibt sich aus der H,C-Korrelation via ^1J -Kopplung (C,H), die mittels HSQC in Abbildung 3-10 dargestellt ist. Einen Kreuzpeak zeigen dabei Protonen mit denjenigen tertiären Kohlenstoffatomen, an die sie direkt gebunden sind. Die Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome folgt

aus dem HMBC, wobei H,C-Korrelationen über 2, 3 und 4 Bindungen hinweg zu sehen sind (Abb. 3-11).

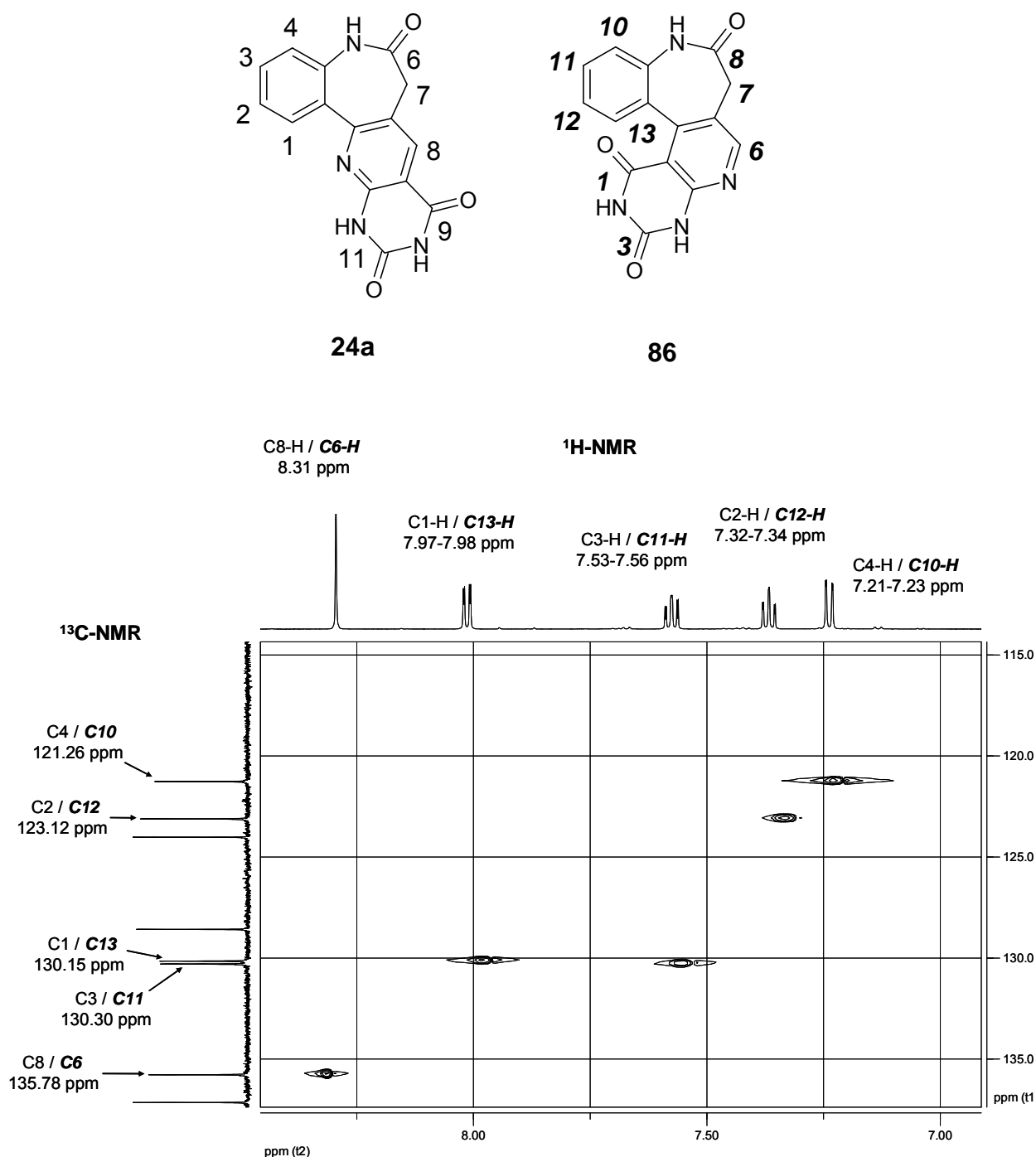
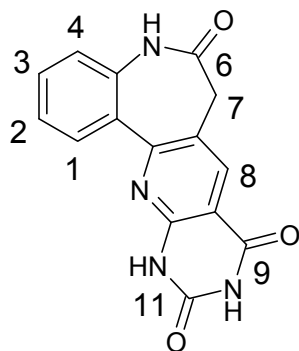
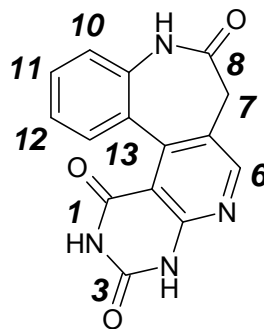
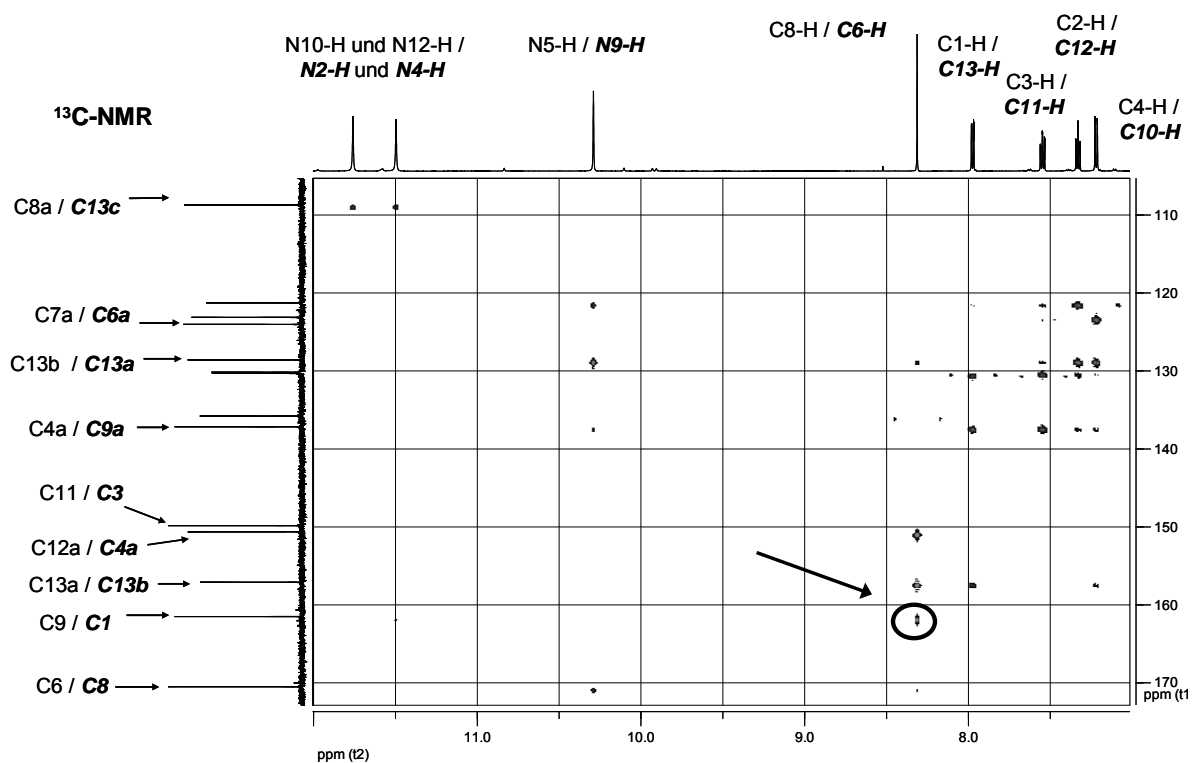


Abbildung 3-10: HSQC der Verbindung **24a**

Eine theoretische Zuordnung zu der ausgeschlossenen alternativen Struktur **86** erfolgt durch fett-kursiv gedruckte Ziffern.

**24a****86****¹H-NMR****Abbildung 3-11:** HMBC der Verbindung **24a**

Die Korrelation zwischen dem C9-Carbonyl-Kohlenstoffatom und dem C8-Pyridin-Proton ist markiert. Eine theoretische Zuordnung zu der ausgeschlossenen alternativen Struktur **86** erfolgt durch fett-kursiv gedruckte Ziffern.

Die genaue Zuordnung der Kohlenstoffatome wird im Folgenden tabellarisch dargestellt. Die Bezifferung folgt dabei den systematischen Bezifferungen der Verbindungen **24a** (normal) und **86** (fett-kursiv).

Tabelle 3-2: Zuordnung der Kohlenstoffatome von **24a**

(Eine theoretische Zuordnung zu der ausgeschlossenen alternativen Struktur **86** erfolgt durch fett-kursiv gedruckte Ziffern.)

(sek: sekundäres, t: tertiäres, q: quartäres Kohlenstoffatom;

* : Vorhersage der Lage mit ACDLabs und ChemBioDraw)

| Art des C-Atoms (Lage [ppm]) | Zuordnung | Begründung |
|---------------------------------|--------------------|---|
| sek (38.83) | C7 / C7 | Einziges sekundäres C-Atom |
| q (108.71) | C8a / C13c | Korrelation zu Pyrimidindion-NH's; Im Vergleich zu C12a / C4a hochfeld-verschoben* |
| t (121.26) | C4 / C10 | Im Vergleich zu C1 / C13 hochfeld-verschoben* |
| t (123.12) | C2 / C12 | Im Vergleich zu C3 / C11 hochfeld-verschoben* |
| q (124.02) | C7a / C6a | Korrelation zu Azepin-CH ₂ , keine Korrelation zu aromatischen Protonen; Lage entspricht Vorhersage* |
| q (128.58) | C13b / C13a | Korrelation zu Lactam-NH, Pyridin-H und zu aromatischen Protonen; im Vergleich zu C13a / C13b hochfeld-verschoben* |
| t (130.15) | C1 / C13 | Im Vergleich zu C4 / C10 tieffeld-verschoben* |
| t (130.30) | C3 / C11 | Im Vergleich zu C2 / C12 tieffeld-verschoben* |
| t (135.78) | C8 / C6 | Lage entspricht Vorhersage* |
| q (137.15) | C4a / C9a | Korrelation zu Lactam-NH und zu aromatischen Protonen |
| q (149.84) | C11 / C3 | Im Vergleich zu C9 / C1 hochfeld-verschoben* |
| q (150.63) | C12a / C4a | Korrelation zu Pyridin-H; im Vergleich zu C8a / C13c tieffeld-verschoben* |

| | | |
|------------|--------------------|---|
| q (157.09) | C13a / C13b | Korrelation zu Pyridin-H, zu aromatischen Protonen (C1-H / C13-H und C4-H / C10-H) und zu Azepin-CH ₂ ; im Vergleich zu C13b / C13a tieffeld-verschoben* |
| q (161.50) | C9 / C1 | Korrelation zu Pyrimidindion-NH und zu Pyridin-H; in Vergleich zu C11 / C3 tieffeld-verschoben* |
| q (170.50) | C6 / C8 | Korrelation zu Lactam-NH, zu Pyridin-H und zu Azepin-CH ₂ |

Durch die Auswertung der HSQC- und HMBC-Spektren kann für jedes der beiden Konstitutionsisomere **24a** und **86** eine plausible Zuordnung der Kohlenstoffatome vorgenommen werden. Entscheidend für die Zuordnung zur Struktur **24a** ist das Auftreten einer deutlichen Korrelation im HMBC-Spektrum zwischen dem Kohlenstoffatom bei 161.50 ppm, welches als Carbonyl-Kohlenstoffatom 9 bzw. **1** identifiziert wurde, und dem jeweiligen Pyridin-Proton (Abb. 3-11, markiert). Diese Korrelation ist nur zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoffatom in Position 9 der Verbindung **24a** und dem C8-Pyridin-Proton möglich. Das Isomer **86** wiese 5 Bindungslängen zwischen dem C1-Kohlenstoffatom und dem C6-Pyridin-Proton auf, was höchstens zu einem sehr schwachen Kreuzpeak im HMBC führen würde. Zudem spricht die Lage des tertiären Pyridin-Kohlenstoffatoms bei $\delta = 135.78$ ppm eher für eine *para*-Position zum Pyridin-N und damit ebenfalls für das Vorliegen des Strukturisomers **24a**. Die *ortho*-Position des tertiären Kohlenstoffatoms zum Pyridin-Stickstoff, wie sie bei **86** zu finden wäre, würde das Kohlenstoff-Signal weiter im tiefen Feld vermuten lassen. Ein weiterer wichtiger Grund, die alternative Struktur **86** auszuschließen, ist auch das Auftreten eines Singulett-Signals für die Methylenprotonen im ¹H-NMR-Spektrum. Wie weiter oben erläutert, wäre für die Struktur **86** eine starke Einschränkung der Ringinversion zu erwarten, was zu einer Aufspaltung des Methylen-Signals führen müsste.

Zusammenfassend lässt sich aus den Betrachtungen des Reaktionsmechanismus und den spektroskopischen Eigenschaften des isolierten Produkts schlussfolgern, dass es sich hierbei um 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trion (**24a**) handelt. Den abschließenden Beweis für diese

Struktur könnte eine Röntgenkristallstruktur-Analyse bringen. Da die Verbindungen allerdings nicht kristallin vorliegen, steht diese Option nicht zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Umsetzung der Enaminone **46**, **47**, **48** und **49** mit 6-Aminouracil (**72**) beziehungsweise 6-Amino-1,3-dimethyl-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion die in Abbildung 3-12 aufgeführten Verbindungen dargestellt.

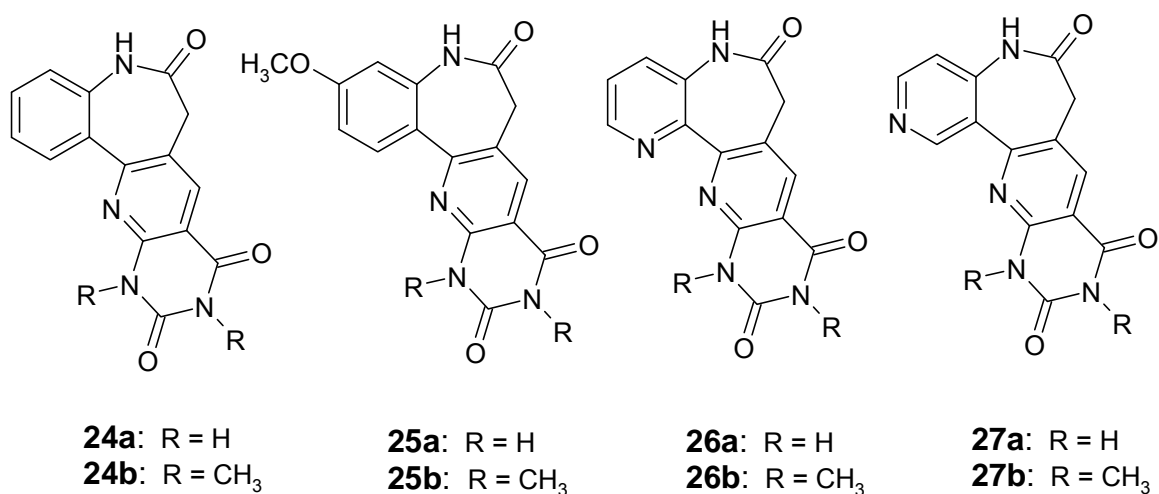
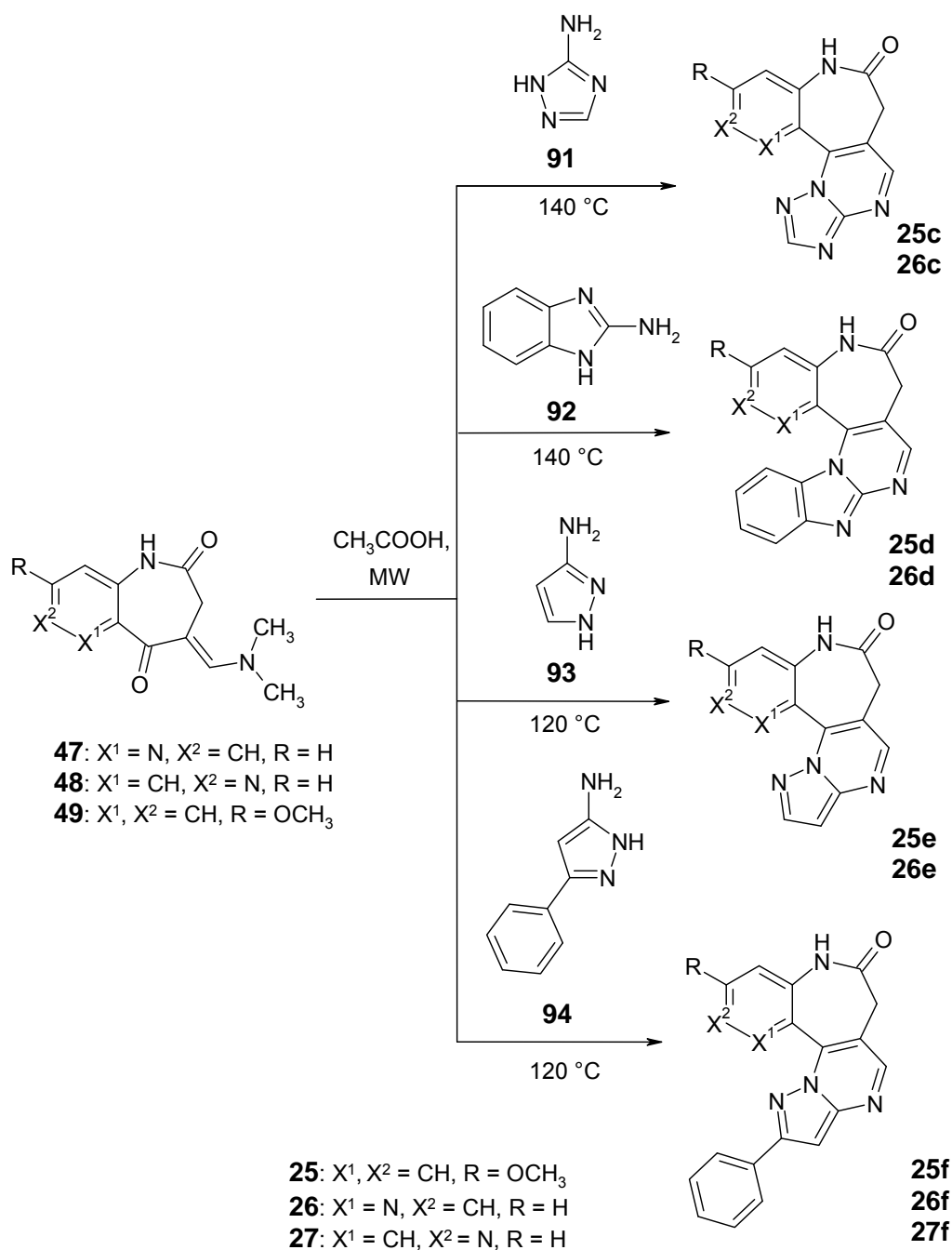


Abbildung 3-12: Dargestellte 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]-benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione **24a-b** und **25a-b** sowie die aza-analogen Verbindungen **26a-b** und **27a-b**

3.5 Synthese weiterer *d*-anellierter 1-Benzazepinone und azaanaloger Verbindungen

Dunkel setzte nach einer Vorschrift von Ming et al.¹¹² Enaminone des Typs **46** mit kommerziell erhältlichen Aminoazolen in Eisessig in der Mikrowelle um.⁶⁵ Diese Reaktionsbedingungen konnten auf die Enaminone **47**, **48** und **49** übertragen werden.



Schema 3-33: Darstellung der Heterozyklen **25c-f**, **26c-f** und **27f**

Wie in Schema 3-33 dargestellt, wurden **47** und **49** mit 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**91**), 2-Aminobenzimidazol (**92**), 3-Aminopyrazol (**93**) und 3-Phenyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**94**) zu den Zykl kondensationsprodukten **25c-f** und **26c-f** umgesetzt. Aus dem Azaenaminon **48** wurde aus Zeitgründen nur die Verbindung **27f** synthetisiert. Die Entstehung möglicher Strukturisomere ist am Beispiel der Reaktion der Enaminone mit 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**91**) in Schema 3-34 abgebildet.

Bei der Umsetzung von Aminoazolen mit Biselektrophilen findet initial ein nucleophiler Angriff der exozyklischen Aminogruppe statt.¹¹³ Dies konnte von Hassaneen et al.¹¹⁴ sowie von Al-Mousawi et al.¹¹⁵ durch Isolierung der entsprechenden Zwischenprodukte belegt werden. Anwar und Mitarbeiter bestätigen diese Beobachtungen durch Röntgenkristallstruktur-Analyse der von ihnen dargestellten Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine.¹¹⁶

Ming und Mitarbeiter diskutieren bei der Umsetzung von Enaminonen mit 3-Aminopyrazol (**93**), ob die Aminogruppe am Enaminon- β -Kohlenstoffatom (Schema 3-34, i) oder am Carbonyl-Kohlenstoffatom (Schema 3-34, ii) angreift. Ersteres konnte auch von dieser Arbeitsgruppe mittels Röntgenstruktur der entstandenen Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine bestätigt werden.¹¹² Übertragen auf die hier verwendeten Edukte, würden im ersten Fall die Zwischenstufen **95** und **96**, im zweiten Fall die Zwischenstufen **99** und **100** entstehen. Wie bereits am Beispiel der 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione (**24a-b**, Kapitel 3.4), gezeigt, wird intermediär die Bildung von **95** bzw. **96** angenommen.

Im Fall des 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**91**) kann der anschließende Ringschluss entweder vom N2-Triazol-Stickstoff (Schema 3-34, iii bzw. v) oder vom N4-Triazol-Stickstoff (Schema 3-34, iv bzw. vi) ausgehen. Damit ist insgesamt die Entstehung von vier verschiedenen Regioisomeren möglich (**25c**, **97**, **101** oder **103** bzw. **26c**, **98**, **102** oder **104**). In der Literatur wird nahezu ausschließlich ein Ringschluss von dem N2-Stickstoff ausgehend beschrieben.^{113, 115, 117, 118}

In Übereinstimmung damit konnte die postulierte Struktur der Verbindung **25c** mittels Röntgenkristallstruktur-Analyse belegt werden (Abb. 3-14). Aus diesem Grund wird auch für die Verbindungen **25d-f**, **26c-f** sowie **27f** angenommen, dass durch initiale Anlagerung der exozyklischen Azol-Aminogruppe an die Enaminon-Doppelbindung die in Schema 3-33 dargestellten Isomere entstanden sind. Für nach Schema 3-34, ii gebildete, an der Pyrimidinteilstruktur linear anellierte Heterozyklen würde die

azepinische Methylengruppe im ^1H -NMR-Spektrum ein scharfes Singulett mit einer Intensität von zwei Protonen erzeugen. Dies kann dadurch begründet werden, dass der Azepinring in diesem Fall konformative Flexibilität aufweist. Durch schnelle Ringinversion sind die Methylenprotonen magnetisch äquivalent und ergeben ein Singulett.¹¹⁹ Die tatsächlich isolierten Heterozyklen zeigen jedoch anstelle eines Singuletts zwei Dubletts mit einer Intensität von jeweils einem Proton für die CH_2 -Gruppe (Abb. 3-13). Dies spricht für eine eingeschränkte Ringinversion des Azepinrings. Verursacht wird die Erhöhung der Inversionsbarriere dadurch, dass der helikal-anellierte Triazolring die Umwandlung der Ringkonformere sterisch behindert. Die Methylenprotonen sind damit nicht mehr magnetisch äquivalent und zeigen zwei getrennte Signale im ^1H -NMR-Spektrum.¹¹⁹

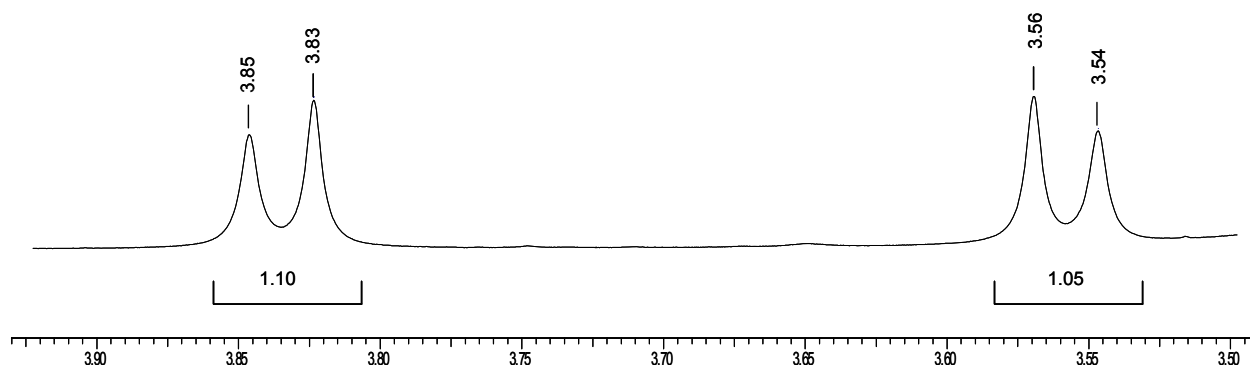
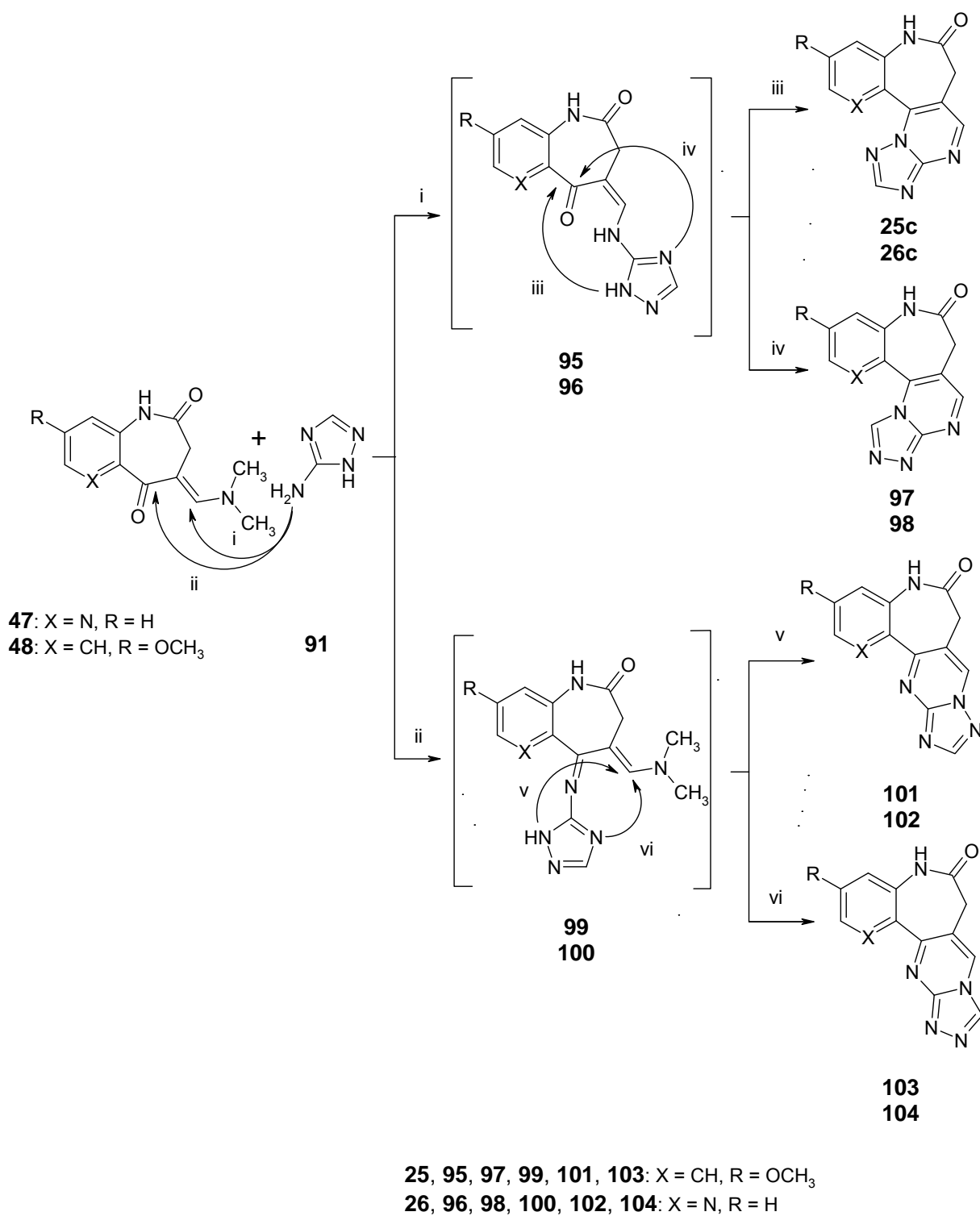


Abbildung 3-13: Azepinische Methylengruppe der Verbindung **26c** im ^1H -NMR-Spektrum (3.50 bis 3.90 ppm)

Dunkel berichtet über eine Röntgenkristallstruktur-Analyse der 11-Iodanaloga von **24e** und **24f** sowie der Verbindung **24c** (**24**: R = H, X = CH). Die dabei erhaltenen Strukturen entsprechen den in Schema 3-33 dargestellten Isomeren.⁶⁵



Schema 3-34: Mögliche Reaktionsmechanismen der Zykl kondensation zur Entstehung von **25c** und **26c**

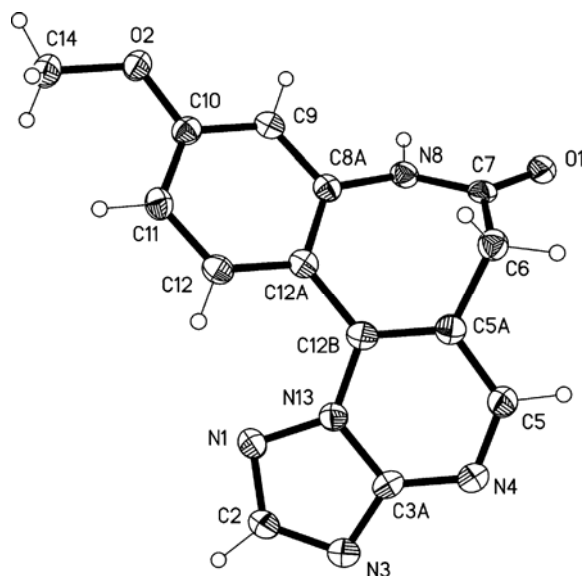


Abbildung 3-14: Röntgenkristallstruktur der Verbindung **25c**

Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

4 Biologische Aktivität

Eine breite Auswahl der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen wurde auf ihre kinaseinhibitorische und antiproliferative Aktivität getestet. Im Folgenden werden zunächst die dazu verwendeten Methoden beschrieben. Anschließend wird für die verschiedenen Strukturklassen dargestellt, ob sie in den angewendeten Testsystemen biologische Aktivität gezeigt haben, und es werden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen diskutiert.

4.1 Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

Die dargestellten Verbindungsklassen wurden von der Firma ProKinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, einem breiten Screening an 15 tumorrelevanten Proteinkinasen unterworfen. Außerdem wurde untersucht, ob eine Hemmung der essentiellen Insulin-Rezeptor Kinase (INS-R) auftritt, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte. Für alle getesteten Verbindungen wurden IC₅₀-Profile an den 16 Kinasen erstellt. Der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration 50 %*) beschreibt diejenige Konzentration einer Substanz, bei der die Enzymaktivität um 50 % inhibiert wird. Die genaue Durchführung des Screenings wird in Kapitel 7.3.1 beschrieben. Die IC₅₀-Werte an den 15 Kinasen, die an Proliferation, *survival*, Angiogenese und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind, sowie an INS-R geben die Tabellen 7-13 bis 7-16, Kapitel 7.3.1, wieder.

4.2 Testung der In-vitro-Antitumoraktivität

Einige der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Substanzen wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht. Dazu wurden die Verbindungen an 60 Zelllinien getestet, die sich von 9 verschiedenen Tumorarten ableiten, und zwar von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Kolonkarzinom, Brust- und Ovarialkrebs, Leukämie, Melanomen, Nieren-, Prostata- und ZNS-Krebs.

Von jeder zu testenden Substanz wurde zunächst ein *one dose mean graph* erstellt (beispielhaft dargestellt in Abb. 4-8). Für jede Zelllinie wurde dabei das Wachstum der Zellen in % (*growth percent*) bei einer Inhibitorkonzentration von 10⁻⁵ M bestimmt. Außerdem wurde das durchschnittliche Zellwachstum (*mean growth percent [%]*)

aller Tumorzelllinien ermittelt. Sofern eine Verbindung einen vielversprechenden *one dose mean graph* zeigte, wurden GI_{50} -Werte (*growth inhibition* 50 %) bestimmt. Dazu wurde die jeweilige Substanz in fünf verschiedenen Konzentrationen (10^{-4} bis 10^{-8} M) an 60 Tumorzelllinien getestet. Als Mittelwert der einzelnen GI_{50} -Werte wurde der *meangraph midpoint* (MG-MID) errechnet. Er stellt die durchschnittliche antiproliferative Aktivität einer Substanz gegenüber allen Zelllinien dar.¹²⁰ Eine detaillierte Beschreibung der In-vitro-Tumorzelllinien-Testung des NCI folgt in Kapitel 7.3.2. Abbildung 4-9 stellt den *meangraph* einer der untersuchten Substanzen dar. Die Tabellen 7-17 bis 7-20, Kapitel 7.3.2, geben das ermittelte Zellwachstum sowie die GI_{50} -Werte für alle getesteten Verbindungen an.

4.3 Biologische Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

4.3.1 Kinaseinhibitorische Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

Die von Kohfeld beschriebenen 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **10** wurden an 24 Kinasen getestet und zeigten dabei vor allem eine Hemmung der Kinasen VEGF-R2 und -R3, Aurora A und B, PLK1, TIE2, FAK und SRC im niedrig mikro- bis nanomolaren Bereich.⁶¹ Die kinaseinhibitorische Wirkung der hier vorgestellten Anilinopyrimidine **12**, **13** und **14** wurde an 16 Kinasen untersucht. Im Folgenden wird die Aktivität dieser neuen Strukturen an den Kinasen VEGF-R2, Aurora B, PLK1, FAK und SRC beschrieben und mit den Daten der Ausgangsverbindungen **10** verglichen. Anhand der IC_{50} -Werte werden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen diskutiert.

Zunächst wird die Funktion der genannten Kinasen in der Tumorgenese beschrieben:

VEGF-R2 (*vascular endothelial growth factor receptor* 2)

Die Rolle der Rezeptor-Tyrosinkinase VEGF-R2 in der Angiogenese und die Bedeutung einer antiangiogenen Antitumorthérapie wurden bereits ausführlich in Kapitel

1.2.4 vorgestellt. Zugelassene Kinaseinhibitoren wie Sunitinib (Sutent[®], Pfizer, **7**) und Sorafenib (Nexavar[®], Bayer, **8**) hemmen unter anderem auch VEGF-R2 (Abb. 4-1).

mosome aufweisen. Diese genetisch veränderten Zellen können unkontrolliertes Wachstum zeigen.¹²⁴

Das Indolinon Hesperadin (Boehringer-Ingelheim, **105**) gehört zu den erstmalig beschriebenen selektiven Aurora B-Inhibitoren (Abb. 4-2). Es stellt ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung von Aurora B-Funktionen dar.¹²²

VX-680 (Vertex/Merck, **106**) inhibiert Aurora A, B und C im niedrig nanomolaren Bereich (Abb. 4-2). Da das 4,6-Diaminopyrimidin **106** auch die Bcr-Abl Kinase hemmt, wird die Möglichkeit einer Behandlung von Imatinib-resistenten Patienten untersucht. VX-680 befindet sich in Phase II der Klinischen Prüfung.^{122, 125}

Bei MLN8054 (Millenium Pharmaceuticals, **107**) handelt es sich um einen selektiven Aurora A-Inhibitor (Abb. 4-2). Gegenüber Aurora A zeigt das 2-Benzazepin **107** in vitro einen IC_{50} -Wert von 4 nM, Aurora B wird bei 127 nM inhibiert. Auch MLN8054 wird zurzeit klinischen Studien unterzogen.¹²⁶

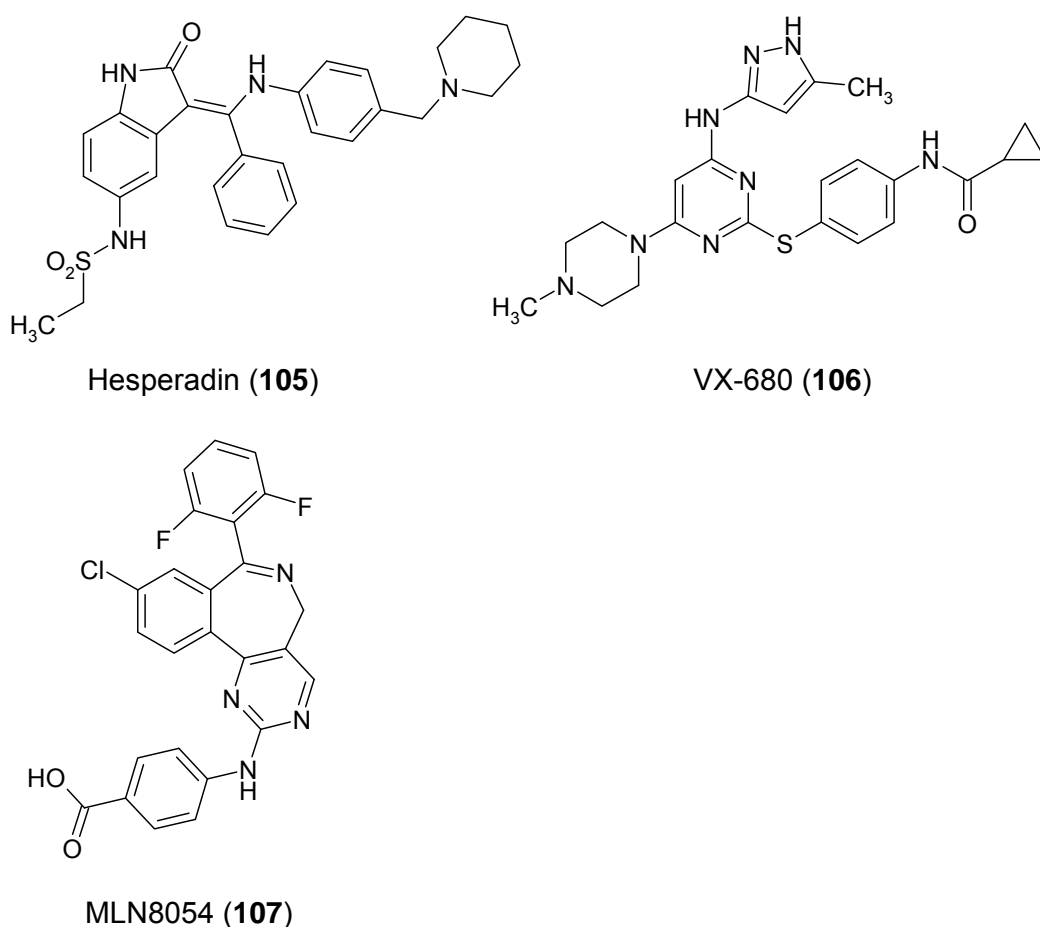
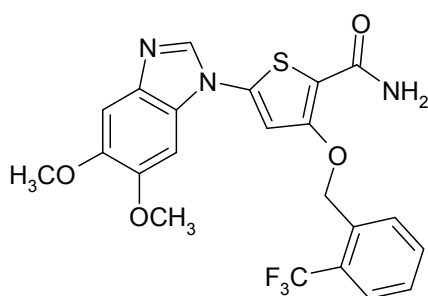
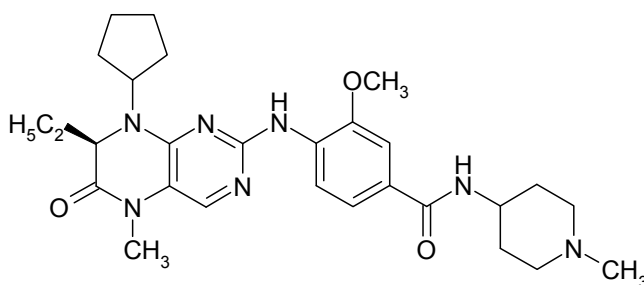


Abbildung 4-2: Inhibitoren von Aurora Kinasen

PLK1 (*polo-like kinase 1*)

Wie die Aurora-Kinasen ist auch die PLK-Familie (*polo-like kinases*) in die Zellzyklus-Kontrolle involviert. Zu dieser Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen zählen PLK1, PLK2 (Synonym: SNK, *serum-inducible kinase*), PLK3 (Synonyme: CNK, *cytokine-inducible kinase*; FNK, *FGF-inducible kinase*; PRK, *proliferation-related kinase*) und PLK4 (Synonym: SAK, *Snk akin kinase*). PLK1 ist die am besten charakterisierte Kinase der humanen PLK-Familie. Expression und Aktivität von PLK1 sind während der G0-, G1- und S-Phase des Zellzyklus gering, steigen im Lauf der G2-Phase an und erreichen während der Mitose-Phase ihren Höhepunkt. PLK1 ist zunächst an den Zentrosomen und Kinetochoren lokalisiert und befindet sich dann während der Anaphase am zentralen Spindelapparat. Zu den Aufgaben von PLK1 gehört die Aktivierung des CDK1-Cyclin B-Komplexes und damit die Einleitung der mitotischen Zellteilung (*mitotic entry*). Außerdem werden Zentrosomen-Reifung und Aufbau des Spindelapparats beeinflusst.^{122, 127, 128} Durch Phosphorylierung des Tumor-Suppressor-Proteins p53 wird dessen proapoptotische Funktion inhibiert.¹²⁷

Compound 1 (**108**)BI 2536 (**109**)Abbildung 4-3: PLK1-Inhibitoren

Da PLK1 in einer Vielzahl von humanen Tumoren überexprimiert wird und die Kinase damit ein vielversprechendes Target in der Antitumorthherapie darstellt, wurden in den letzten Jahren ATP-kompetitive PLK1-Inhibitoren entwickelt. Das Thiophenbenzimidazol **108** (Glaxo SmithKline) hemmt PLK1 in vitro bei einem IC₅₀-Wert von 2 nM, PLK3 wird bei 9 nM inhibiert (Abb. 4-3). Kinasen außerhalb der PLK-Familie werden durch **108** nicht beeinflusst. **108** zeigt darüber hinaus antiproliferative Aktivität gegen-

über zahlreichen humanen Tumorzelllinien.¹²⁹ Auch das Dihydropteridinon BI 2536 (Boehringer Ingelheim, **109**) hemmt PLK1 bei einem IC₅₀-Wert von 1 nM, PLK2 und PLK3 zwischen 4-9 nM (Abb. 4-3).¹²² BI 2536 befindet sich zurzeit in klinischer Untersuchung an Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierenden Tumoren.¹³⁰

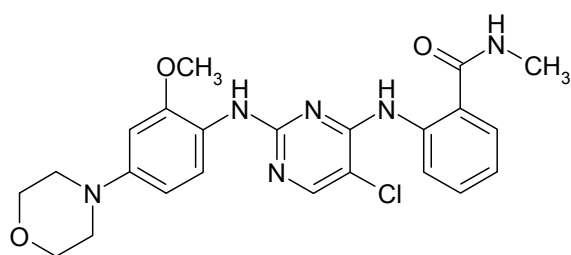
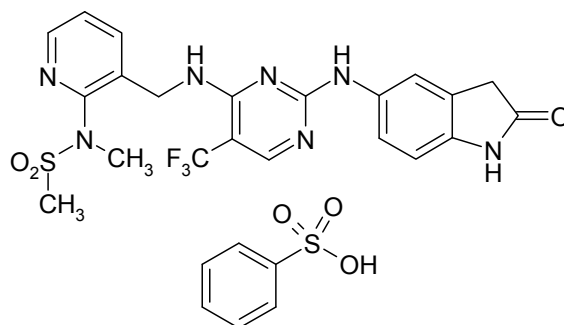
FAK (*focal adhesion kinase*, Synonym: PTK 2)

FAK ist eine ubiquitär exprimierte, zytoplasmatische Tyrosinkinase, deren Aktivierung Anheftung, Migration, Invasion, Proliferation und Überleben von Zellen unterstützt. Als fokale Adhäsionen (FA) werden Verbindungen zwischen dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (ECM) bezeichnet. FAs setzen sich unter anderem aus Integrinen, transmembranären Proteinen, die direkt an die ECM gebunden sind, und verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen zusammen. Auf Zellen, die durch FAs verankert sind, wirken Kräfte ein, die zur Anspannung des kontraktile Zytoskeletts führen. Diese Spannung gilt als aktivierender Faktor für Proliferation und Migration. FAK wird durch zelluläre Adhäsion aktiviert. Dadurch wird die Verankerung der Zelle zum einen verstärkt, zum anderen aber auch der Abbau der FA reguliert (*turnover*). FAK wird als Mechanosensor bezeichnet, da die Kinase eine Migration der Zelle zu einem möglichst festen Untergrund bewirkt.^{131, 132}

Eine Überexpression von FAK wird für primäre und metastasierende Tumore beschrieben, wie invasive Kolon- und Brusttumore, metastasierende Prostatakarzinome und maligne Melanome.¹³¹

Für den ATP-kompetitiven Kinaseinhibitor NVP-TAE 226 (Novartis, **110**¹³³) wird eine duale Hemmung von FAK und IGF-1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) beschrieben. Invasion und Proliferation von Gliomazellen wird durch NVP-TAE 226 in vitro und in vivo inhibiert (Abb. 4-4).¹³⁴

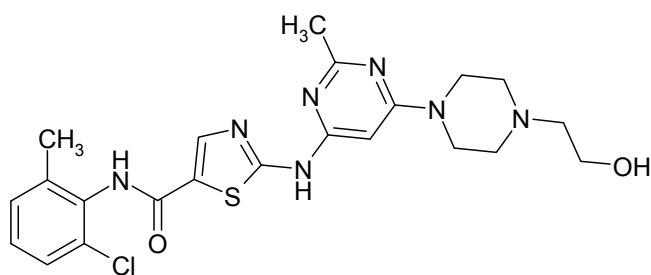
Der niedermolekulare FAK/Pyk2-Inhibitor PF-562,271 (Pfizer, **111**¹³⁵) zeigte antiproliferative Wirkung in Maus-Modellen von Prostata-, Brust-, Darm-, Lungen- und Bauchspeicheldrüsen-Krebs (Abb. 4-4). Auch der Einsatz bei Knochentumoren war vielversprechend. PF-562,271 befindet sich zurzeit in Phase I der klinischen Prüfung.^{132, 136}

NVP-TAE 226 (**110**)PF-562,271 (**111**)Abbildung 4-4: Inhibitoren der FAK-KinaseSRC (*v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*)

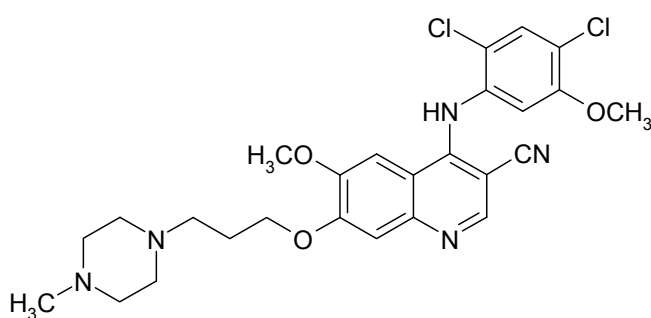
Die Familie der Src-Kinasen gehört zu den Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen und besteht aus 8 Mitgliedern (Lyn, Hck, Lck, Blk, Src, Fyn, Yes und Fgr), die in zahlreiche zelluläre Signaltransduktionswege eingebunden sind. So ist Src beispielsweise an der Weiterleitung von Signalen beteiligt, die der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR und Her2 folgen. Auf diese Weise werden Metabolismus, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und Migration verschiedener Zellarten kontrolliert. Src selbst gehört zu den am längsten bekannten Onkogenen.^{137, 138} Src-Inhibitoren werden unter anderem in der Behandlung von Leukämie und Brustkrebs eingesetzt und scheinen auch dazu geeignet, die bei Brustkrebs häufig auftretenden Knochenmetastasen zu behandeln.^{138, 139, 140, 141, 142}

So hemmt der Multikinase-Inhibitor Dasatinib (Sprycel[®], Bristol-Myers Squibb, **6**) unter anderem auch Kinasen der Src-Familie (Abb. 4-5). Zurzeit wird in Phase II-Studien untersucht, ob Dasatinib auch zur Behandlung von Brustkrebs zugelassen werden kann.¹³⁸

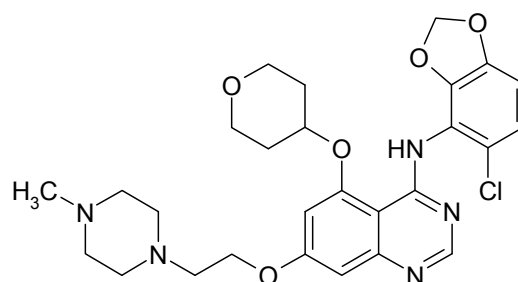
Der Src-Inhibitor Bosutinib (SKI-606, Wyeth, **112**) befindet sich in Phase-II der klinischen Prüfung. Er soll zur Behandlung verschiedener Tumore, unter anderem auch von Brustkrebs, eingesetzt werden (Abb. 4-5).¹⁴³ AZD0530 (AstraZeneca, **113**) stellt einen potenten dualen Inhibitor von c-Src und Bcr-Abl dar, der ebenfalls in einer Phase-II-Studie untersucht wird (Abb. 4-5).^{142, 144}



Dasatinib (6)



Bosutinib (SKI-606, 112)



AZD0530 (113)

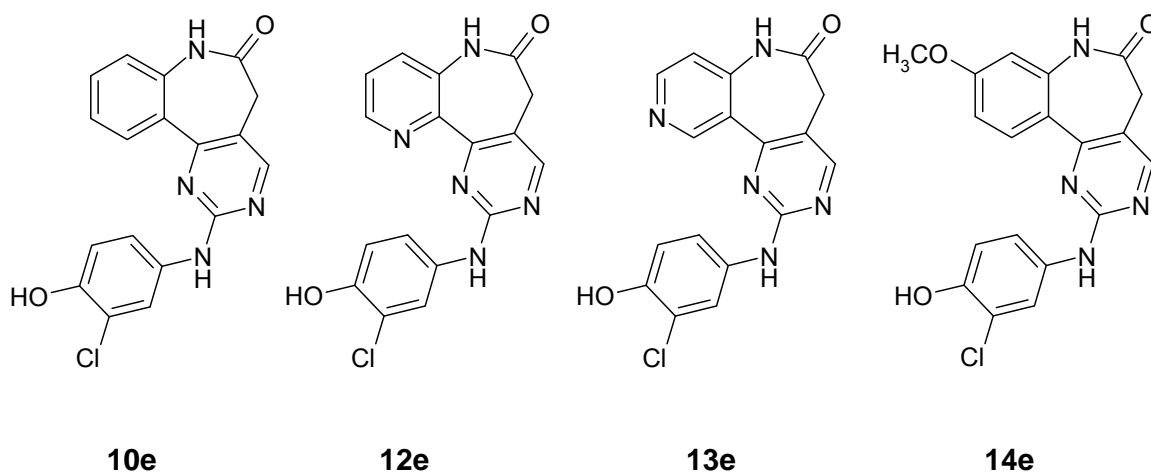
Abbildung 4-5: Inhibitoren von Src-Kinasen

Es folgt die Beschreibung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Anilinopyrimidine **10**, **12**, **13** und **14**.

Die stärkste inhibitorische Wirkung gegenüber den getesteten Kinasen zeigte bei Kohfeld das 2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**10e**).⁶¹

Die Einführung eines Stickstoffatoms in Position 11 führte zu einer deutlichen Verschlechterung der biologischen Aktivität von **12e** um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Die Azaverbindung **13e**, welche das Stickstoffatom in Position 10 aufweist, war im Vergleich dazu ähnlich aktiv wie die Ausgangsstruktur **10e**. Das 9-Methoxy-Derivat **14e** zeigte eine gesteigerte Hemmung der Proteinkinasen und ist damit die in vitro am stärksten aktive Verbindung dieser Arbeit. Die IC₅₀-Werte [μM] werden in Tabelle 4-1 dargestellt. Die 3'-Chlor-4'-hydroxydisubstitution erwies sich für alle vier Grundgerüste als besonders vorteilhaft (Abb 4-6).

Tabelle 4-1: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **10e**, **12e**, **13e** und **14e** an ausgewählten Proteinkinasen



| | VEGF-R2 | Aurora B | PLK-1 ^a | FAK | SRC | cLogP ^b |
|------------|---------|----------|--------------------|------|------|--------------------|
| 10e | 0.035 | 2.3 | 9.3 | 0.80 | 1.4 | 3.18 ± 0.50 |
| 12e | 0.67 | 26 | | 42 | 10 | 2.36 ± 0.52 |
| 13e | 0.087 | 3.3 | 1.4 | 1.5 | 1.3 | 2.69 ± 0.53 |
| 14e | 0.011 | 0.37 | 0.36 | 0.22 | 0.73 | 3.35 ± 0.53 |

^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

^b Die cLogP-Werte wurden mit dem Programm ACD/LogP Freeware (Version 11.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) berechnet.

Die unterschiedliche Wirkstärke der vier hier zu vergleichenden Anilinopyrimidin-Gruppen konnte für alle dargestellten Phenylsubstituenten **a-f** (**f** nur für **10** und **14**) beobachtet werden, wie in Abbildung 4-6 für die Kinase VEGF-R2 gezeigt. Demnach wirkten die Verbindungen **14a-f** am stärksten kinaseinhibitorisch. **13a-e** waren etwas weniger aktiv als **10a-e**, und die Azaderivate **12a-e** zeigten sich deutlich schwächer aktiv.

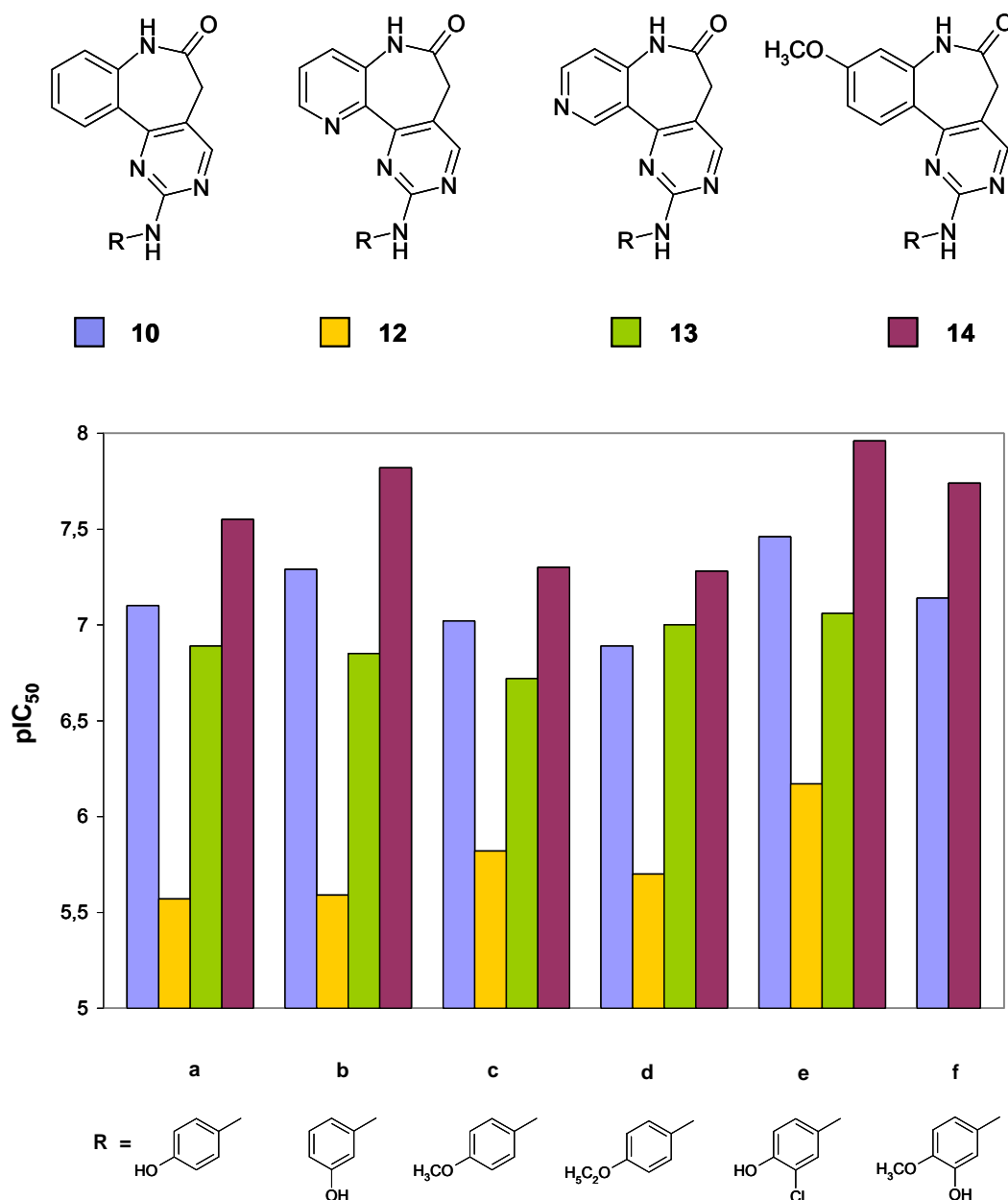
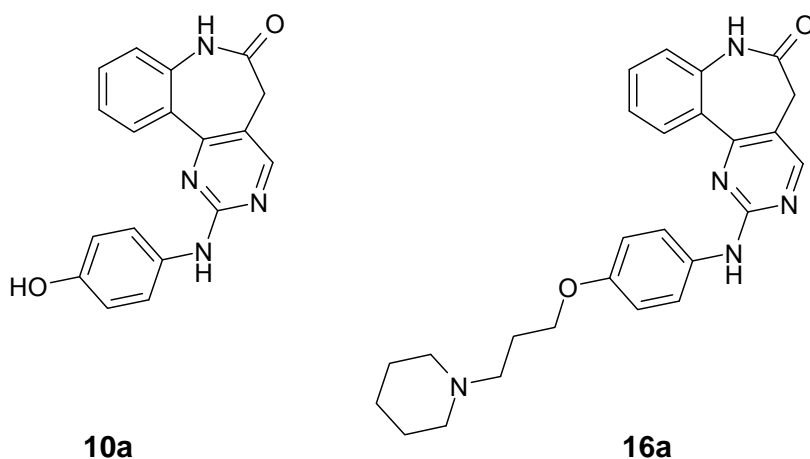


Abbildung 4-6: VEGF-R2-Inhibition der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]-benzazepin-6-one **10** und **14** sowie der azaanalogen Derivate **12** und **13**

Eine deutliche Steigerung der kinaseinhibitorischen Wirkung konnte durch Einführung des 1-Piperidinyloxy-Restes in 4'-Position erreicht werden. Die Verbindung **16a** zeigte sich um ca. eine Zehnerpotenz aktiver als die 4'-Hydroxy-Verbindung **10a**. Insbesondere die Zellzyklus-kontrollierenden Kinasen Aurora B und PLK1 wurden

von **16a** im niedrig mikromolaren Bereich gehemmt, während die IC_{50} -Werte von **10a** für diese Kinasen größer als 100 μM waren. Allerdings wurde auch die essentielle Kinase INS-R von **16a** inhibiert ($IC_{50} = 34 \mu M$). (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: IC_{50} -Werte [μM] der Verbindungen **10a** und **16a** an ausgewählten Proteinkinasen



| | VEGF-R2 | Aurora B ^a | PLK-1 ^a | FAK | SRC | INS-R | cLogP ^b |
|------------|---------|-----------------------|--------------------|------|-----|-------|--------------------|
| 10a | 0.080 | | | 3.2 | 64 | | 2.19 ± 0.48 |
| 16a | 0.026 | 11 | 1.1 | 0.43 | 1.1 | 34 | 4.32 ± 0.54 |

^a Fehlende Werte sind mit IC_{50} -Werten > 100 μM gleichzusetzen.

^b Die cLogP-Werte wurden mit dem Programm ACD/LogP Freeware (Version 11.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) berechnet.

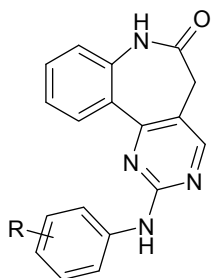
4.3.2 Ergebnisse der zellulären Assays der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido-[5,4-d][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

Da die Anilinopyrimidine **10** in vitro eine vielversprechende kinaseinhibitorische Aktivität zeigten, wurden sie von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, zusätzlich in zellulären Assays getestet, und zwar unter anderem an humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (*human umbilical vein endothelium cells*, HUVEC), die gezielt VEGF-R2 überexprimieren. Die Inhibition von VEGF-R2 wurde mittels geeigneter ELISA-Autophosphorylierungs-Assays getestet, wodurch der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor gemessen werden konnte. Als Referenz diente der potente Multikinase-Inhibitor Staurosporin (**114**). Wie von Kohfeld beschrieben, zeigten die Verbindungen **10b**, **10e** und **10f** in dem zellulären Testsystem IC₅₀-Werte, die um etwa zwei Größenordnungen über den Werten lagen, die in den In-vitro-Assays ermittelt wurden (Tabelle 4-3).⁶¹

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellten strukturell modifizierten Derivate **13** und **14** zeigten in vitro vergleichbar gute bzw. sogar niedrigere IC₅₀-Werte an den untersuchten Kinasen (Kapitel 4.3.1). Daher sollte für **13d** und **13e** sowie für **14d** und **14e** untersucht werden, inwieweit sich die Strukturveränderungen auf die Inhibition von VEGF-R2 in HUVEC auswirkt. Der zelluläre Assay wurde wiederum von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, durchgeführt. Die in vitro und zellulär erhaltenen IC₅₀-Werte sind für alle getesteten Verbindungen in Tabelle 4-3 aufgeführt. Während die 10-Azaderivate **13d** und **13e** im Vergleich zu **10b**, **10e** und **10f** schwächer aktiv waren, konnte für die 9-Methoxyverbindungen **14d** und **14e** eine bis zu siebenfach gesteigerte Aktivität an HUVE-Zellen festgestellt werden.

Die Einführung eines Stickstoffatoms in das Inhibitor-Gerüst führte zwar zu einer Abnahme der Lipophilie der jeweiligen Verbindung, was sich in einem niedrigeren cLogP-Wert ausdrückt, dies scheint sich aber nicht positiv auf die Zellgängigkeit von **13** auszuwirken. Zumindest wurde keine gesteigerte Aktivität gegenüber den Ausgangsverbindungen **10** erreicht. Die cLogP-Werte für die in zellulären Systemen untersuchten Derivate sind ebenfalls in Tabelle 4-3 dargestellt.

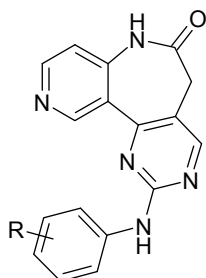
Tabelle 4-3: Vergleich der Hemmung von VEGF-R2 in In-vitro-Systemen und zellulären Systemen (IC_{50} [μM]) durch Anilinopyrimidine des Typs **10**, **13** und **14**



10b: R = 3'-OH

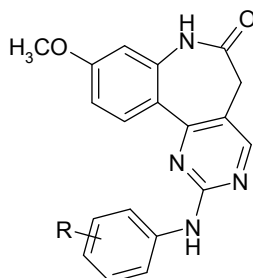
10e: R = 3'-Cl, 4'-OH

10f: R = 3'-OH, 4'-OCH₃



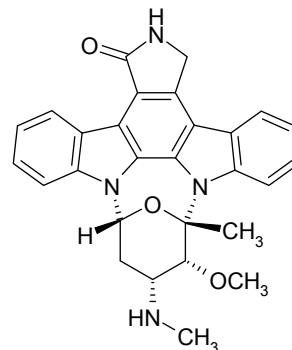
13d: R = 4'-OC₂H₅

13e: R = 3'-Cl, 4'-OH



14d: R = 4'-OC₂H₅

14e: R = 3'-Cl, 4'-OH



Staurosporin (**114**)

| | in vitro | zellulär ^a | cLogP-Wert ^c |
|------------|----------|------------------------|-------------------------|
| 10b | 0.059 | 4.9/2.2 ^b | 2.58 ± 0.49 |
| 10e | 0.038 | > 10/> 10 ^b | 3.18 ± 0.50 |
| 10f | 0.073 | 3.8/3.2 ^b | 2.32 ± 0.50 |
| 13d | 0.099 | > 10 | 2.92 ± 0.52 |
| 13e | 0.087 | > 10 | 2.69 ± 0.53 |
| 14d | 0.052 | 0.45 | 3.58 ± 0.52 |
| 14e | 0.011 | 0.88 | 3.35 ± 0.53 |
| 114 | 0.0068 | 0.088/0.059 | 4.40 ± 1.42 |

^a Alle Werte setzen sich aus zwei Einzelmessungen zusammen.

^b Ergebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

^c Die cLogP-Werte wurden mit dem Programm ACD/LogP Freeware (Version 11.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) berechnet.

Die Anilinopyrimidine **14d**, **14e** sowie die aminoalkoxylierte Verbindung **16a** sind außerdem in einem Sphäroid-basierten zellulären Angiogenese-Assay daraufhin untersucht worden, ob sie die Sprossung von endothelialen Zellen (HUVEC) beeinflussen. Dieser Assay wurde ebenfalls von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, durchgeführt. Dazu wurden zunächst Endothelzell-Sphäroide gezüchtet.¹⁴⁵ Die Sphäroide wurden in eine kollagen-haltige Lösung überführt, welche anschließend zu einem Kollagengel polymerisierte. Während einzelne, nicht adhärente Endothelzellen (EC) durch Apoptose eingehen, stellen Sphäroide stabilere Zellaggregate dar, von denen nach Einbettung in eine Gelmatrix eine strahlenförmige Kapillarsprossung ausgeht. Bei der Verwendung von HUVEC-Sphäroiden ist dazu der Zusatz von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF notwendig. Mit Hilfe dieses dreidimensionalen Angiogenese-Assays können Substanzen auf ihre antiangiogene Wirkung getestet werden.¹⁴⁶ Neben dem stimulierenden Wachstumsfaktor VEGF-A [25 ng/ml] wurden die zu testenden Substanzen in 7 verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0.3 μ M, 0.1 μ M, 30 nM, 10 nM) dem Sphäroid-Gel hinzugefügt und für 24 h inkubiert. Die Intensität der Zellsprossung wurde mit einem speziellen mikroskopischen Verfahren ausgewertet. Tabelle 4-4 gibt für jede Inhibitor-Konzentration den Mittelwert der kumulierten Zellspross-Längen von 10 zufällig ausgewählten Sphäroiden sowie die Standardabweichung an. Als Vergleichssubstanz diente der VEGF-R-Inhibitor Vatalanib (PTK787/ZK222584, Bayer Schering Pharma AG, Novartis, **115**).¹⁴⁷ Vatalanib befindet sich zurzeit in Phase II der klinischen Prüfung zur Behandlung von Imatinib-resistenten gastrointestinalen Stromatumoren.¹⁴⁸ Wie aus Tabelle 4-4 hervorgeht, inhibierten **14d**, **14e** sowie **16a** die VEGF-A induzierte HUVEC-Sprossung bei IC₅₀-Werten im submikro- bis nanomolaren Bereich. Damit erwiesen sich die untersuchten Verbindungen jedoch als 10fach schwächer aktiv als Vatalanib.

4.3.3 Antiproliferative Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

Von den im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Anilinopyrimidinen wurden die Verbindungen **12b**, **12d**, **13b**, **13d** sowie **14d** beim NCI auf ihre antiproliferative Aktivität hin untersucht. Von jeder Verbindung wurde zunächst ein *one dose mean graph* erstellt, der das Zelllinien-Wachstum [%] nach Inkubation mit der zu testenden Substanz sowie das durchschnittliche Wachstum [%] aller Zelllinien darstellt.

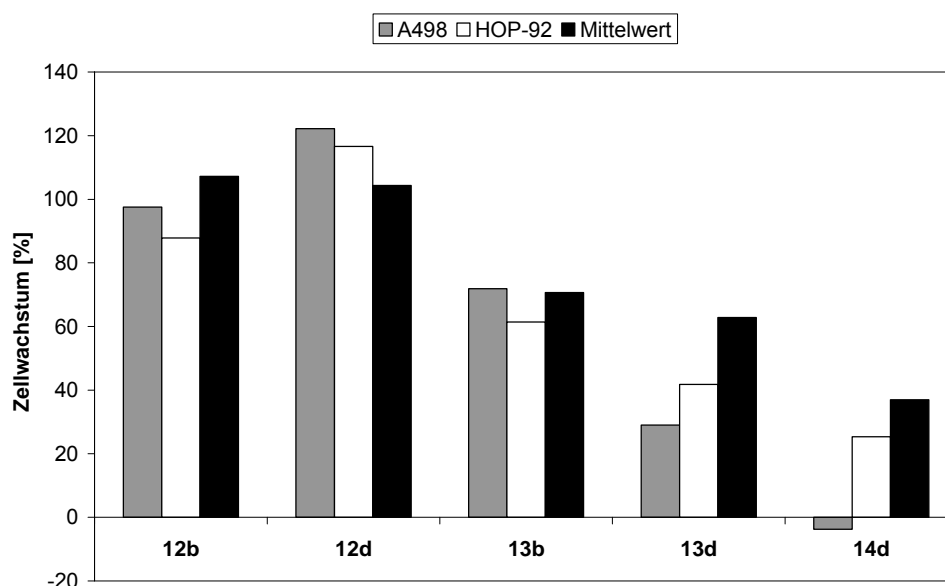
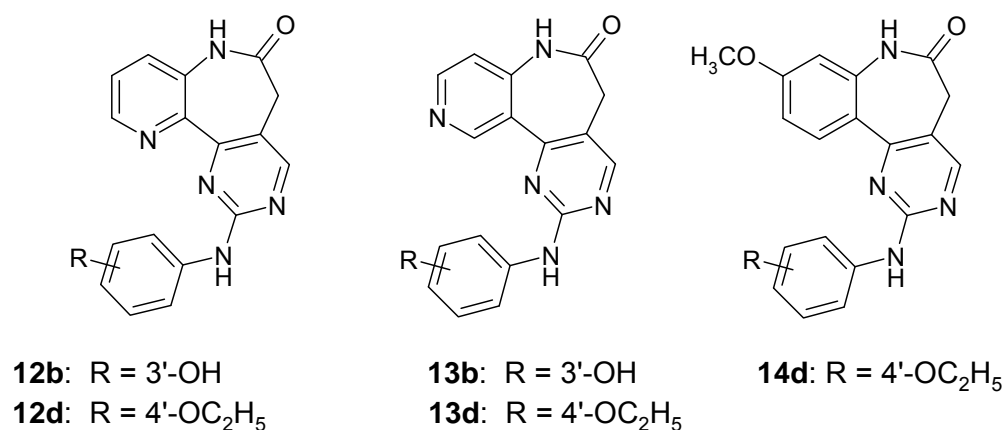


Abbildung 4-7: Auswirkung von **12b**, **12d**, **13b**, **13d** und **14d** [10 μ M] auf das Wachstum ausgewählter Tumorzelllinien. Der Mittelwert bezieht sich auf alle getesteten Zelllinien.

In Abbildung 4-7 ist das Zellwachstum von zwei Krebszelllinien nach Behandlung mit den jeweiligen Anilinopyrimidinen dargestellt. Es handelt sich dabei um A498, eine Nierenkrebs-Zelllinie, und um HOP-92, eine Zelllinie, die von einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom abstammt. Der Mittelwert beschreibt das durchschnittliche Wachstum aller Zelllinien.

Die 11-Azaderivate **12b** und **12d** übten im Durchschnitt keinen Einfluss auf das Tumorzell-Wachstum aus. Unter der Wirkung der 10-Azaderivate **13b** und **13d** wurde ein mittleres Zellwachstum von 71 bzw. 63 % beobachtet. Die stärkste antiproliferative Wirkung zeigte das 9-Methoxy-Derivat **14d**. Es hemmte das Wachstum der Zellen durchschnittlich um 63 %.

Der *one dose mean graph* von **14d** ist in Abbildung 4-8 dargestellt. Für jede Zelllinie sind Querbalken angegeben. Diese stellen den Wert (Mittleres Zellwachstum [%] - Zellwachstum [%]) dar. Liegt das durchschnittliche Wachstum einer Zelllinie unterhalb des Mittelwerts - werden die Zellen also stärker inhibiert - weist der Balken nach rechts. Ein nach links zeigender Balken steht für ein Zellwachstum, das oberhalb des Durchschnittswerts liegt. Anhand des *one dose mean graphs* wird entschieden, ob die Testsubstanzen weiter untersucht werden.

Von den Verbindungen **13d** und **14d** wurden anschließend GI_{50} -Werte angefertigt. Diese werden in Tabelle 4-5 für ausgewählte Tumorzelllinien mit den GI_{50} -Werten der von Kohfeld dargestellten Verbindungen **10a-c** und **10e-f** verglichen. Die antiproliferative Aktivität der Anilinopyrimidine **10** wird erstmalig in dieser Arbeit beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse des In-vitro-Antitumorscreenings des NCI sagen, dass die Verbindungen **10** GI_{50} -Werte im niedrig mikro- bis nanomolaren Bereich zeigten. Die stärkste antiproliferative Aktivität zeigte das 3'-hydroxy-4'-methoxydisubstituierte Derivat **10f**. Im Vergleich dazu wies die 10-Azaverbindung **13d** eine etwas niedrigere durchschnittliche antiproliferative Aktivität gegenüber allen getesteten Zelllinien (MG-MID-Wert) auf, während **14d** ähnlich aktiv war wie **10f**. Alle getesteten Verbindungen hemmten vor allem Nierentumor-Zelllinien, wie A498 und ACHN (Tabelle 4-5). Nierenzellkarzinome (*renal cell carcinoma*, RCC) sind meist stark vaskularisierte Tumorarten, die mit antiangiogenen Arzneistoffen wie Sunitinib (**7**) und Sorafenib (**8**), welche unter anderem VEGF-R2 inhibieren, behandelt werden.^{37, 42}

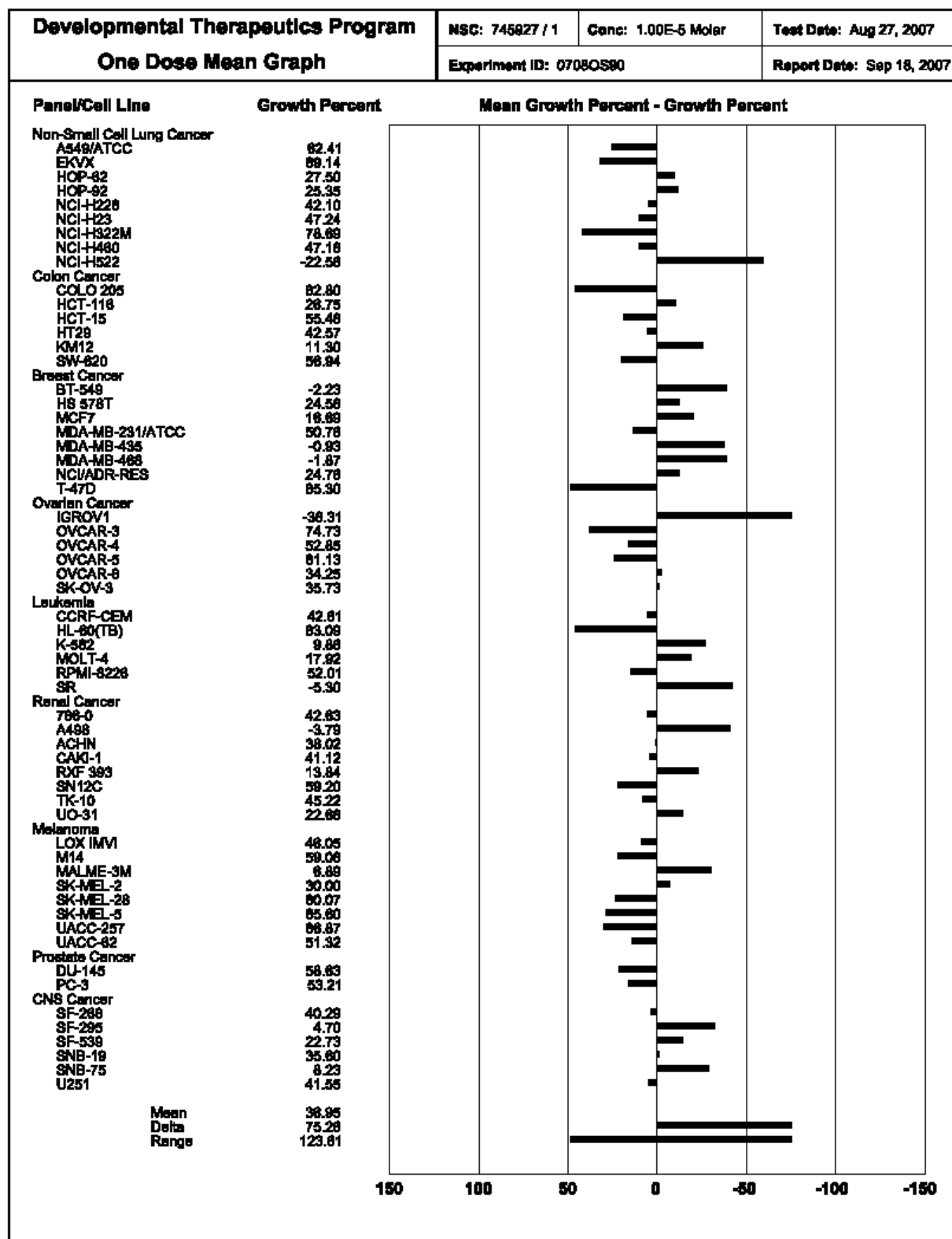
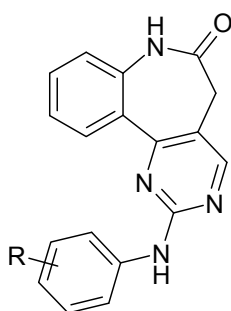


Abbildung 4-8: One dose mean graph von 14d

Tabelle 4-5: In-vitro-Antitumoraktivität $\log_{10} \text{GI}_{50}$ [M] der Anilinopyrimidine **10a-c**, **10e-f**, **13d** und **14d**



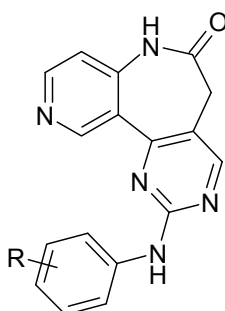
10a: R = 4'-OH

10b: R = 3'-OH

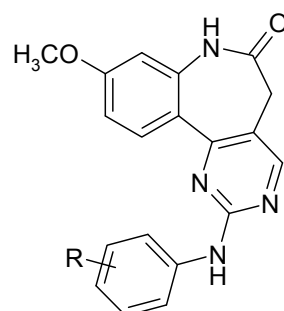
10c: R = 4'-OCH₃

10e: R = 3'-Cl, 4'-OH

10f: R = 3'-OH, 4'-OCH₃



13d: R = 4'-OC₂H₅



14d: R = 4'-OC₂H₅

| | MG-MID ^a | A498 ^a | ACHN ^a | HOP-92 ^a |
|------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| 10a | -5.09/-4.33 | -6.02/-4.82 | -6.17/-4.48 | -5.93/-4.84 |
| 10b | -5.21/-5.06 | -5.30/-5.36 | -6.27/-5.58 | -6.08/-5.95 |
| 10c | -5.59/-5.11 | -5.77/-6.42 | -6.58/-5.85 | -6.28/-5.78 |
| 10e | -5.17 | -4.88 | -6.49 | -6.11 |
| 10f | -5.91/-5.77 | -5.87/5.62 | -6.84/-6.67 | -6.44/-7.10 |
| 13d | -5.0 | -6.28 | -5.94 | -5.47 |
| 14d | -5.65 | -6.43 | -6.21 | -6.51 |

^a Ergebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

Die GI_{50} -Werte der untersuchten Verbindungen werden graphisch als Balkendiagramm, dem sog. *meangraph*, dargestellt. Der *meangraph* der Verbindung **14d** ist in Abbildung 4-9 dargestellt. Die senkrechte Mittellinie des Diagramms zeigt den *meangraph midpoint* (MG-MID) als durchschnittliche antiproliferative Aktivität einer Substanz.

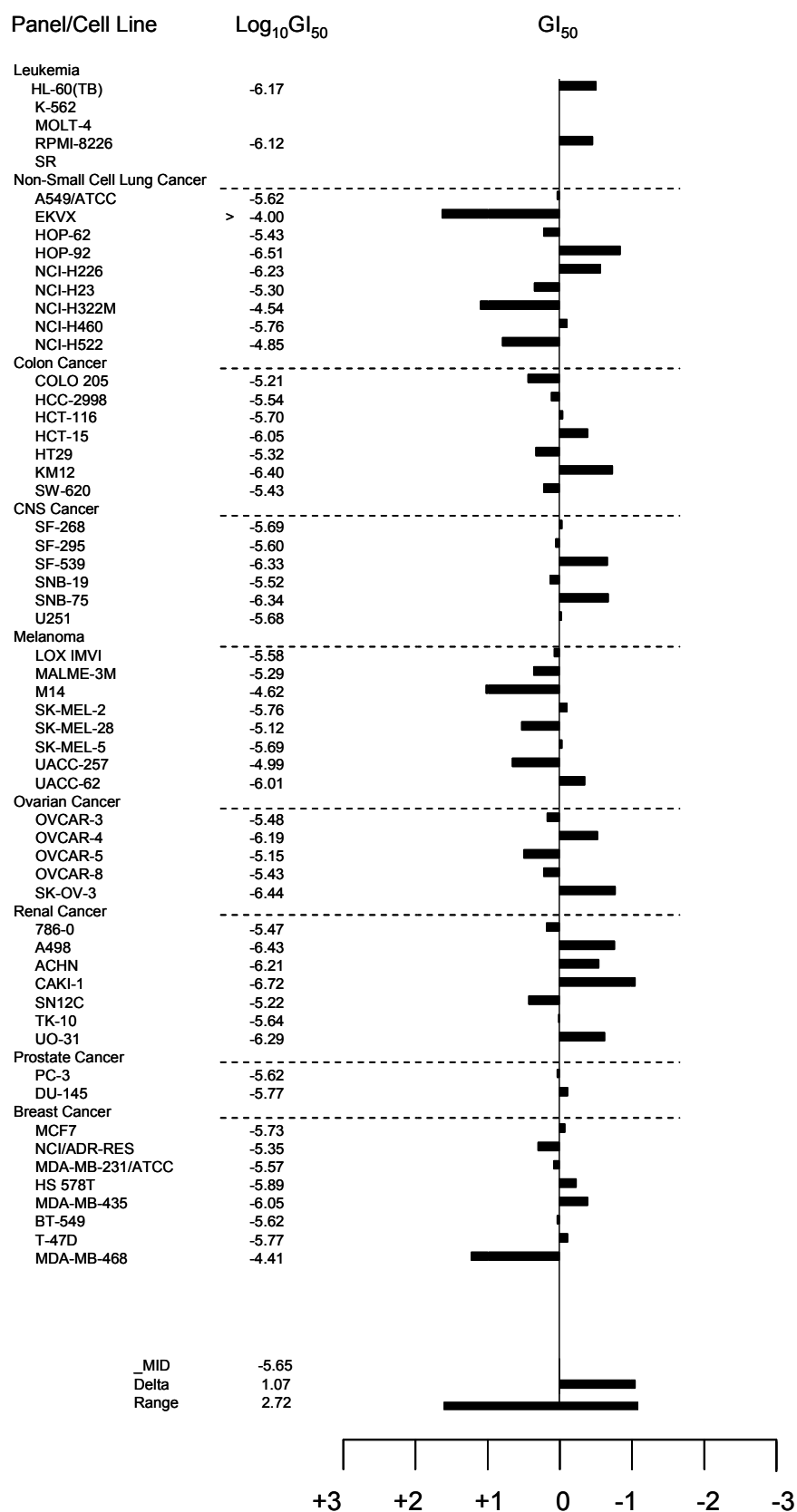


Abbildung 4-9: Meangraph von 14d

Ist die Hemmwirkung gegenüber einer Zelllinie stärker als der MG-MID-Wert, wird dies durch einen nach rechts gerichteten Balken ausgedrückt. Die Länge dieses Balkens steht für die Differenz aus \log_{10} MG-MID und \log_{10} GI₅₀-Wert. Nach links gerichtete Balken kennzeichnen Zelllinien, für die der GI₅₀-Wert oberhalb des MG-MIDs liegt. Wird durch die höchste angewandte Inhibitorkonzentration von 10^{-4} M keine Hemmung des Zellwachstums um 50 % erreicht, so wird der \log_{10} GI₅₀-Wert mit „> -4“ angegeben, wie z. B. für die NSCLC-Zelllinie EKVX (Abb. 4-9). Ein charakteristisches Profil des *meangraph* ist ein Hinweis auf einen spezifischen Inhibitionsmechanismus der getesteten Substanz.¹⁴⁹

Die Selektivitätsprofile verschiedener Substanzen können computergestützt mit dem Programm „COMPARE“ miteinander verglichen werden. Dazu erhält man für den Vergleich von zwei Verbindungen, die beim NCI getestet wurden, einen Zahlenwert, den sog. Pearson Korrelationskoeffizienten (*Pearson correlation coefficient*, PCC). Dieser kann Zahlenwerte von -1 bis +1 annehmen. Ein PCC von +1 tritt dann auf, wenn zwei Verbindungen identische Selektivitätsprofile aufweisen.

Tabelle 4-6: Ergebnisse der COMPARE-Analyse der Anilinopyrimidine **10a-c**, **10e-f**, **13d** und **14d**^a

| PCC | 10a | 10b | 10c | 10e | 10f | 13d |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 14d | 0.489 (58) | 0.399 (58) | 0.454 (57) | 0.156 (49) | 0.397 (57) | 0.501 (58) |
| 13d | 0.578 (59) | 0.614 (59) | 0.683 (58) | 0.403 (50) | 0.641 (58) | |
| 10f | 0.607 (58) | 0.791 (58) | 0.828 (57) | 0.73 (50) | | |
| 10e | 0.654 (50) | 0.864 (50) | 0.725 (50) | | | |
| 10c | 0.751 (58) | 0.863 (58) | | | | |
| 10b | 0.79 (59) | | | | | |

^a In Klammern ist die Anzahl der Zelllinien angegeben, für die GI₅₀-Werte der untersuchten Substanzen ermittelt wurden.

Bereits bei PCC's > 0.35 können Substanzklassen in Gruppen eingeteilt werden¹⁴⁹, wobei die Gruppierung dann wahrscheinlich auf ähnlichen Wirkungsmechanismen innerhalb der Substanzklassen beruht.⁷¹

Für die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **10a-c** und **10e-f** wurden drei PCCs > 0.8 und 5 PCCs zwischen 0.7 und 0.8 gefunden. Aufgrund dieser hohen Korrelationen kann ein gemeinsamer antiproliferativer Wirkmechanismus von **10** angenommen werden. Interessanterweise wurden für die 10-Azaverbindung **13d** höhere Korrelationen mit **10** gefunden als für das 9-Methoxyderivat **14d**. (Tabelle 4-6)

4.3.4 Vorgeschlagener Bindemodus der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one und azaanaloger Derivate

Der Bindemodus der Anilinopyrimidine **10**, **12**, **13** und **14** in der ATP-Bindetasche von verschiedenen Proteinkinasen wurde in molekularen Docking-Studien* untersucht. Im Folgenden wird die unterschiedliche kinaseinhibitorische Aktivität der einzelnen Anilinopyrimidin-Strukturklassen anhand der Ergebnisse des molekularen Docking am Beispiel der Kinase VEGF-R2 diskutiert. VEGF-R2 stellt die Kinase dar, die am stärksten durch die Anilinopyrimidine **10**, **12**, **13** und **14** inhibiert wurde.

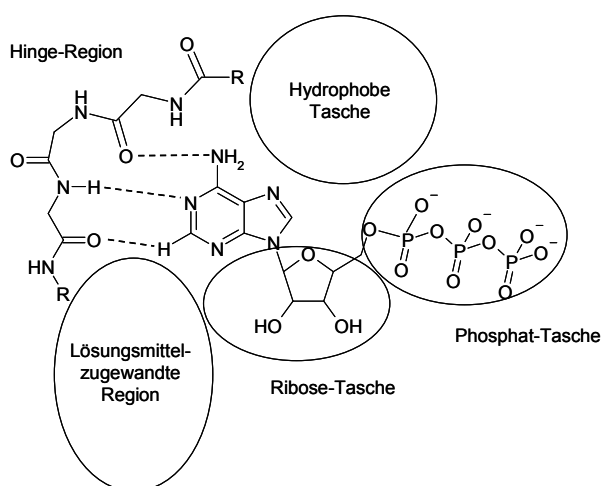


Abbildung 4-10: Schematische Darstellung von ATP in der Bindetasche (modifiziert nach Vulpetti et al.¹)

*Die molekularen Docking-Studien wurden von Jan Dreher, Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, durchgeführt.

Wie in Abbildung 4-10 schematisch dargestellt, bindet ATP selbst über drei Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Adenin-Grundkörper des ATP und Aminosäuren der Hinge-Region ausgebildet werden (Donor-Akzeptor-Donor-Prinzip). Außerdem geht der Adenin-Teil des ATP starke hydrophobe Wechselwirkungen in der Bindetasche ein.¹ Abbildung 4-11 gibt einen wahrscheinlichen Bindemodus des 2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-ons (**10e**) in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 wieder. Demnach bindet **10e** über Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend vom Anilinopyrimidin-Teils des Moleküls an die Aminosäure Cystein 917 der Hinge-Region. Der Benzazepinon-Teil ist in Richtung der Phosphat-Tasche orientiert und der 3'-Chlor-4'-hydroxyphenyl-Substituent ragt in die *solvent accessible region* und damit aus der Bindetasche heraus. Die Einführung eines Stickstoffatoms in Position 11 des Molekülgrundgerüsts führte zu einer deutlichen Abnahme der kinaseinhibitorischen Aktivität der Verbindungen **12**. Abbildung 4-12 zeigt eine Position des 11-Azaderivats **12e** in der ATP-Bindetasche, die in dieser Form nicht von dem verwendeten Docking-Programm vorhergesagt wurde, sondern zur besseren Vergleichbarkeit manuell erzwungen wurde. Die relativ schwache Hemmung von VEGF-R2 durch **12e** lässt sich damit begründen, dass es in dem abgebildeten Bindemodus zu einer Abstoßung zwischen dem N11-Stickstoff von **12e** und der Carbonylgruppe des Leucin 838 kommt. In der Darstellung des Wasserstoffbrücken-Bildungspotentials sind die beiden aufeinander treffenden Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren rot gefärbt. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung dieser negativ polarisierten Bereiche können die 11-Azaderivate **12** vermutlich weniger gut in der ATP-Tasche binden. Der Effekt dieser Abstoßung scheint vermindert zu werden, wenn der Stickstoff formal von Position 11 in Position 10 verschoben wird. Die durch das Docking vorhergesagte Orientierung der 10-Azaverbindung **13e** entspricht wieder der des Ausgangsmoleküls **10e** (Abb. 4-13). Dementsprechend unterschieden sich **10e** und **13e** in ihrer kinaseinhibitorischen Aktivität nur geringfügig. Ein Methoxy-Substituent in 9-Position führte zu einer gesteigerten Hemmung der Kinasen im Vergleich zu **10e**. Durch den zusätzlichen Substituenten scheint **14e** die ATP-Bindetasche von VEGF-R2 besonders gut auszufüllen (Abb. 4-14). Die für die Docking-Studien verwendeten Programme sind in Kapitel 7.3.3 aufgeführt.

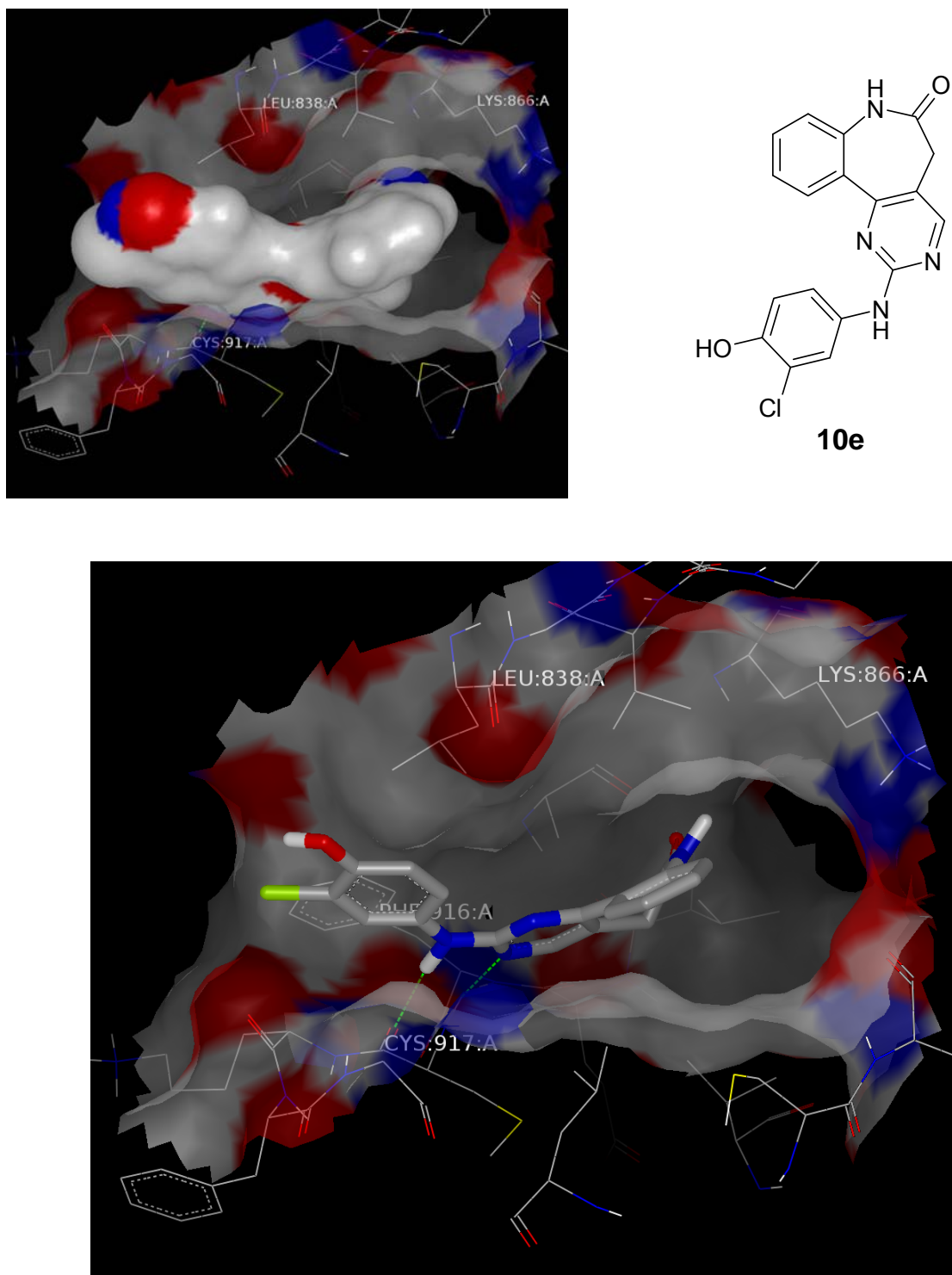


Abbildung 4-11: Mögliche Docking-Pose von **10e** in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 sowie Darstellung des Wasserstoffbrücken-Bildungspotentials*

*negativ polarisierte Bereiche sind rot gefärbt, positiv polarisierte Bereiche sind blau gefärbt, Wasserstoffbrückenbindungen sind grün dargestellt.

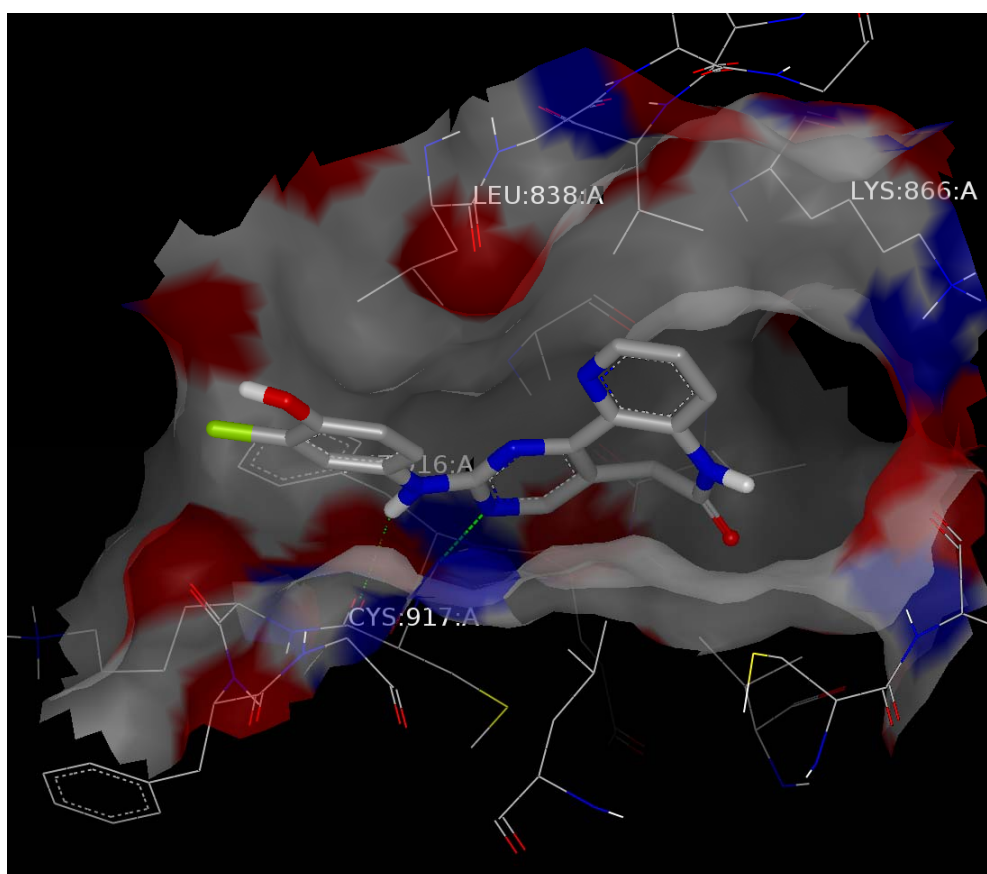
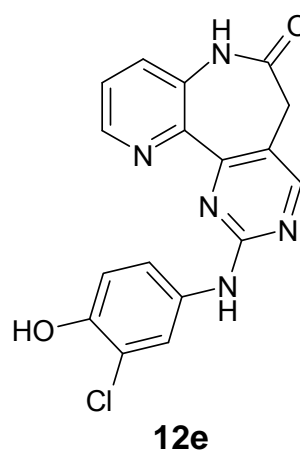
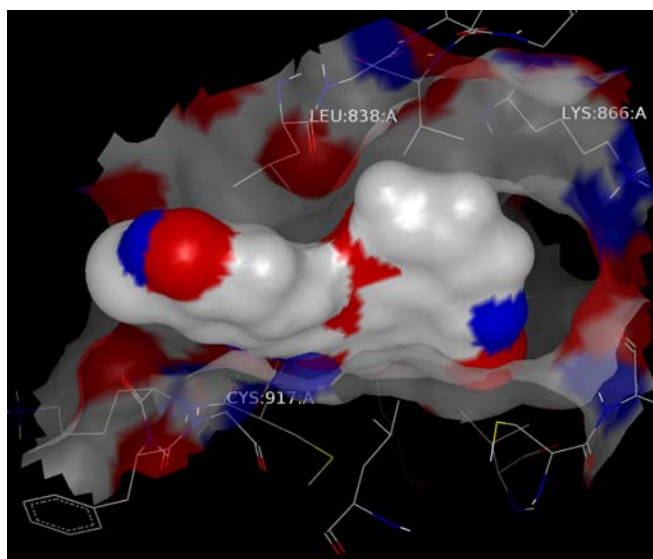


Abbildung 4-12: Mögliche Docking-Pose von **12e** in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 sowie Darstellung des Wasserstoffbrücken-Bildungspotentials*

*negativ polarisierte Bereiche sind rot gefärbt, positiv polarisierte Bereiche sind blau gefärbt, Wasserstoffbrückenbindungen sind grün dargestellt.

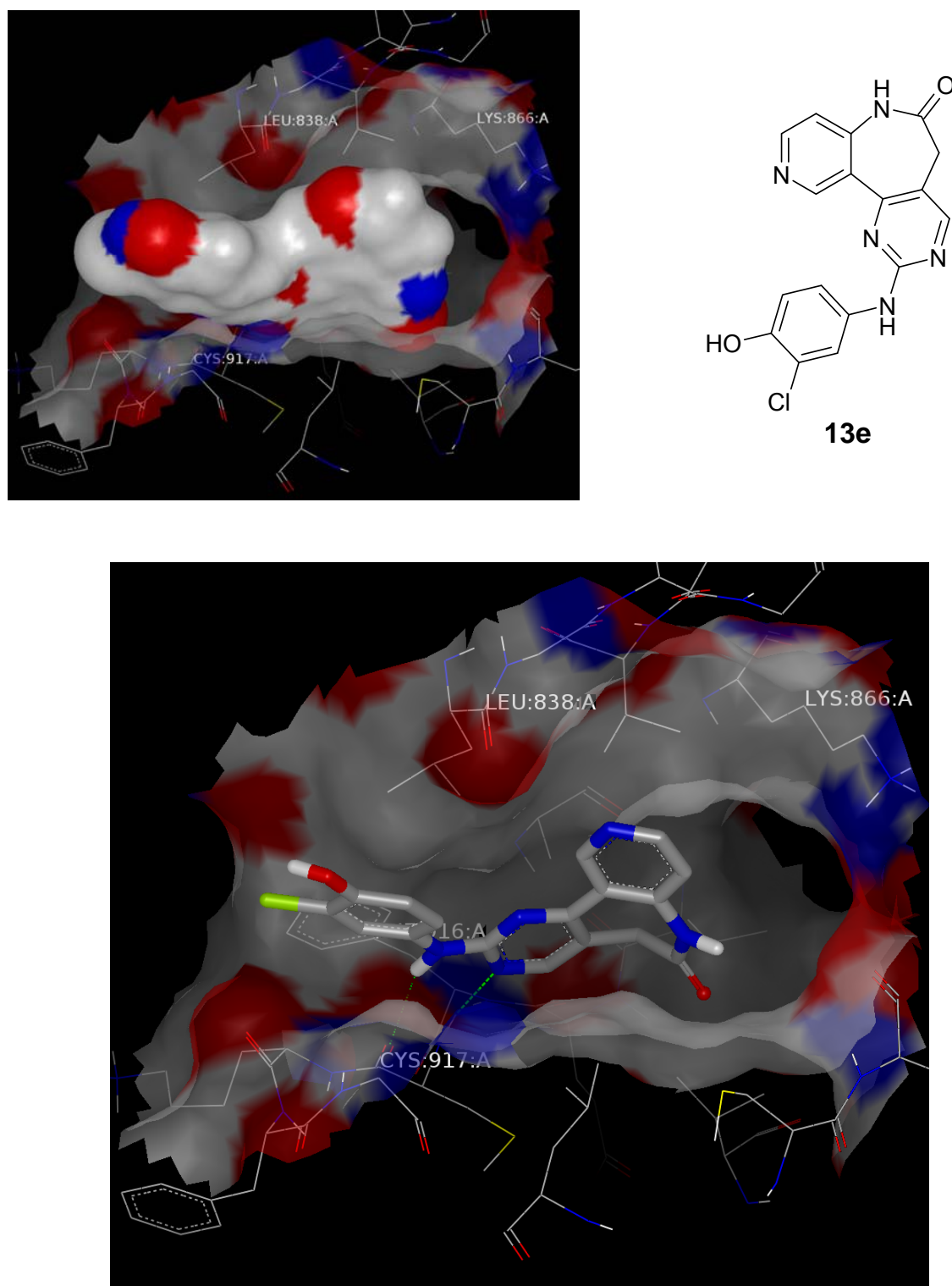


Abbildung 4-13: Mögliche Docking-Pose von **13e** in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 sowie Darstellung des Wasserstoffbrücken-Bildungspotentials*

*negativ polarisierte Bereiche sind rot gefärbt, positiv polarisierte Bereiche sind blau gefärbt, Wasserstoffbrückenbindungen sind grün dargestellt.

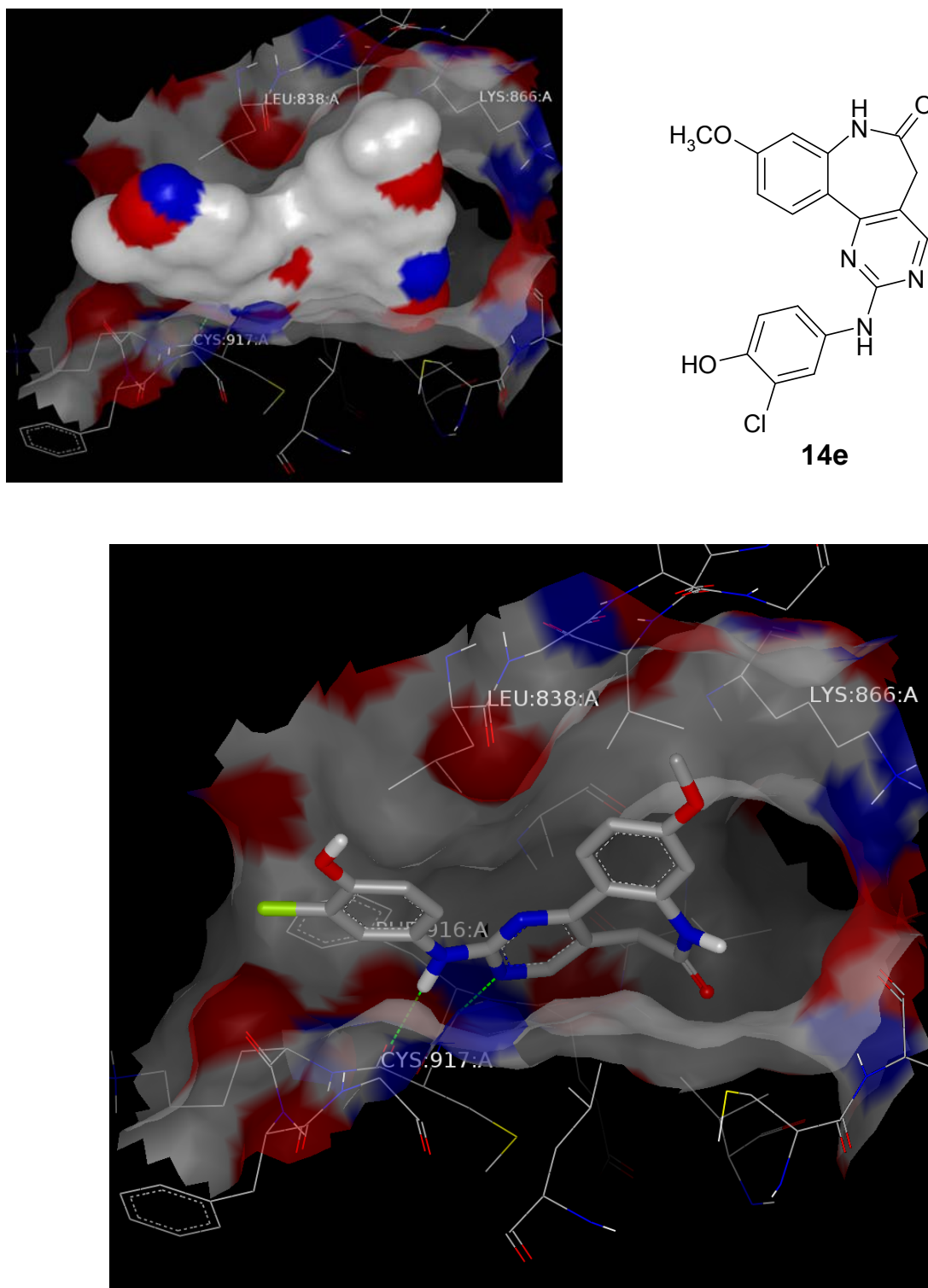
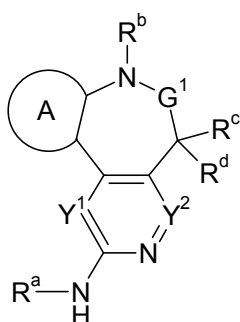


Abbildung 4-14: Mögliche Docking-Pose von **14e** in der ATP-Bindetasche von VEGF-R2 sowie Darstellung des Wasserstoffbrücken-Bildungspotentials*

*negativ polarisierte Bereiche sind rot gefärbt, positiv polarisierte Bereiche sind blau gefärbt, Wasserstoffbrückenbindungen sind grün dargestellt.



116

- A : optional substituierter 5- oder 6-gliedriger Aryl- oder Heteroaryl-Ring
G¹: C=O, C=S, SO₂
Y¹: N oder CH
Y²: N oder CR
R^a: H, -C(O)R, -C(O)N(R)₂, -CO₂R, -SO₂R, SO₂N(R)₂,
optional substituierter, aliphatischer Ring (C₁₋₁₀),
optional substituierter Aryl-, Heteroaryl- oder heterozyklischer Ring

Abbildung 4-15: Lactam-Grundkörper der von Millenium Pharmaceuticals, Inc. beanspruchten Proteinkinase-Inhibitoren¹⁵⁰

Mit diesem Patent, das parallel zu der von Kohfeld angefertigten Arbeit⁶¹ offengelegt wurde, werden auch die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **10**, die 11- und 10-Aza-Derivate **12** und **13**, die 9-Methoxyanilinopyrimidine **14** sowie die in 2'-Position aminoalkoxylierte Verbindung **16a** erfasst. Die Patentschrift enthält 1279 konkrete Verbindungen, Beispiele für die Azaderivate **12** und **13** und die 2-Anilino-9-methoxy-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **14** sowie **16a** sind jedoch nicht enthalten.¹⁵⁰ Die dargestellten Strukturen wurden in Protein-

kinase-Enzym-Assays auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber Aurora A und B, Chk-1 und PLK1 untersucht. Die diesbezüglichen Ergebnisse werden nur exemplarisch und in allgemeiner Form angegeben. Die getesteten Verbindungen werden für die einzelnen Kinasen in Inhibitoren mit IC_{50} -Werten $\leq 5 \mu\text{M}$ und $\leq 0.5 \mu\text{M}$ eingeteilt. Darüberhinaus wurden zelluläre und In-vivo-Assays durchgeführt, deren Ergebnisse allerdings nicht erwähnt werden. Untersuchungen zum Bindemodus der Strukturen **116** in den ATP-Bindetaschen von verschiedenen Kinasen sind in der Patentschrift nicht enthalten.¹⁵⁰

Abschließend kann festgestellt werden, dass mit den Anilinopyrimidinen **12**, **13**, **14** und **16a** Verbindungen dargestellt werden konnten, die interessante Wirkungen in biologischen In-vitro-Testsystemen zeigen. Aufgrund ihres Molekulargewichts und der cLogP-Werte weisen sie physikochemische Eigenschaften auf, die als *drug-like* bezeichnet werden können. Damit stellen sie günstige Ausgangsstrukturen für zukünftige Optimierungsprozesse dar.

4.4 Testung der antiproliferativen Aktivität der 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]benzazepin-5(1*H*)-one und Azaanaloge

Die von Kohfeld synthetisierten 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **11** zeigten in vitro eine sehr ausgeprägte antiproliferative Aktivität gegenüber Zelllinien des NCI. Vor allem die 4'-Methoxy- und 3',5'-Dichlor-substituierten Derivate hemmten die Melanom-Zelllinie MDA-MB-435 sowie die Brustkrebszelllinie HS 578T bereits in sehr niedrigen Konzentrationen.^{61, 64}

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die azaanalogen Pyrazole **20a-b** und **21a** sowie die 8-Methoxy-Pyrazole **22a-b** beim NCI auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht werden. Von jeder Verbindung wurde ein *one dose mean graph* bei einer Testkonzentration von $10 \mu\text{M}$ erstellt. Die 10-Azaverbindungen **20a-b** ergaben ein mittleres Tumorzell-Wachstum von ca. 90 %. Das Wachstum einzelner Zelllinien wurde sogar erhöht. So führte die Inkubation der ovariellen Tumorzelllinie IGROV1 mit **20a** zu einem Zellwachstum von 135 %. Interessanterweise hemmten sowohl **20a** als auch **20b** das Wachstum von MDA-MB-435 über 80 %. HS 578T wurde jedoch kaum beeinflusst (Abb. 4-16). Im Vergleich dazu wurde MDA-MB-435 von dem 9-Azapyrazol **21a** nicht inhibiert (Zellwachstum 102 %), HS 578T sogar leicht aktiviert (Zellwachs-

tum 114 %). Die stärkste Hemmung zeigte **21a** gegenüber der leukämischen Zelllinie CCRF-CEM, deren Wachstum bei einer Substanzkonzentration von 10^{-5} M noch 57 % betrug. Das mittlere Wachstum nach Behandlung der Zelllinien mit **21a** ergab 101 % (Abb. 4-16).

Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurden keine GI_{50} -Werte der Aza-pyrazole **20** und **21** bestimmt.

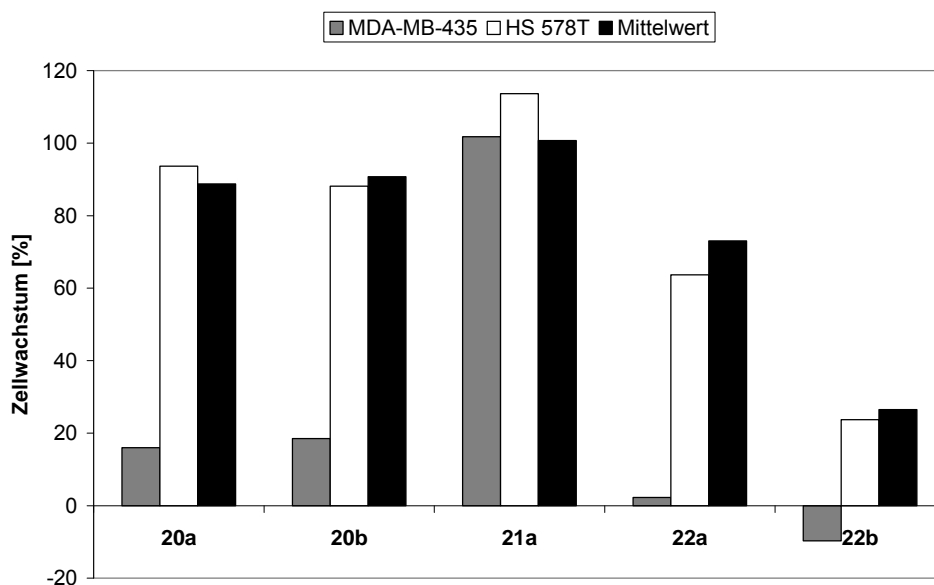
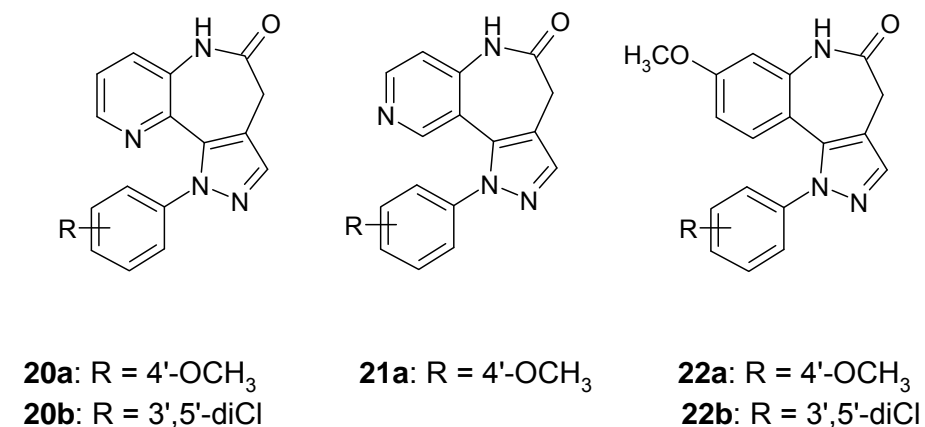


Abbildung 4-16: Wachstum ausgewählter Tumorzelllinien nach Inkubation mit den Pyrazol-Derivaten **20a-b**, **21a** und **22a-b** [10 μ M]. Der Mittelwert bezieht sich auf alle getesteten Zelllinien.

Das 8-Methoxy-Pyrazol **22a** hemmte das Wachstum der Melanom-Zelllinie MDA-MB-435 auf ca. 2 %. Das Wachstum von HS 578T wurde demgegenüber nur auf ca. 64 % inhibiert. Das mittlere Zellwachstum lag bei 73 %. Nach Behandlung mit **22b** ging die Zellmasse von MDA-MB-435 sogar um ca. 10 % zurück, das Zellwachstum von HS 578T betrug noch 24 %. Das 3',5'-dichlorsubstituierte Pyrazol **22b** hatte auf mehrere Zelllinien eine zytotoxische Wirkung. So wurde bei der Ovarialkrebs-Zelllinie OVCAR-3, die von den übrigen hier vorgestellten Pyrazol-Derivaten nur leicht inhibiert wurde, ein Rückgang der Zellmasse um ca. 49 % beobachtet. Die mittlere Wachstumsrate aller getesteten Zelllinien lag bei 27 %. (Abb. 4-16)

Von **22b** wurden aufgrund der Testergebnisse des *one dose mean graph* GI_{50} -Werte beim NCI bestimmt. Besonders niedrige GI_{50} -Werte im nanomolaren Bereich wurden auch hier für die Zelllinien MDA-MB-435 ($\log_{10} GI_{50} = -7.61$) und HS 578T ($\log_{10} GI_{50} = -7.53$) gefunden. Für OVCAR-3 betrug der $\log_{10} GI_{50}$ -Wert -7.36. Mit einem \log_{10} MG-MID-Wert von -6.68 zeigte **22b** eine ausgeprägte durchschnittliche antiproliferative Aktivität gegenüber allen Zelllinien. Die NCI-Daten der Pyrazole **20**, **21** und **22** sind in den Tabellen 7-18 und 7-20, Kapitel 7.3.2 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die antiproliferative Aktivität dieser Verbindungsklasse durch Einführung eines Stickstoffatoms in 9- bzw. 10-Position stark abgenommen hat. **20a-b** zeigten eine selektive Hemmung der Melanom-Zelllinie MDA-MB-435. Diese Wirkung ging bei dem Stellungsisomer **21a** verloren.

Auch das 8-Methoxypyrazol **22a** hemmte vor allem MDA-MB-435. Die stärkste Hemmwirkung insgesamt ging von 1-(3,5-Dichlorphenyl)-8-methoxy-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (**22b**) aus.

4.5 Kinaseinhibitorische Aktivität der 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione und Azaanaloga

Die Testung der kinaseinhibitorischen Aktivität der 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]-pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione **24a-b** und **25a-b** sowie der azaanalogen Verbindungen **26a-b** und **27a-b** erfolgte durch die Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, an 15 tumorrelevanten Kinasen und der Insulin-Rezeptor-Kinase INS-R. Von allen acht Verbindungen wurden IC_{50} -Werte angefertigt. Nur **25a** und **26a-b** zeigten dabei an einzelnen Kinasen IC_{50} -Werte

unter 100 μM (Abb. 4-17). Die stärkste Kinaseinhibition in dieser Serie wurde von **26a** verursacht. Die Verbindung hemmte die Kinasen IGF1-R ($\text{IC}_{50} = 32 \mu\text{M}$), SRC ($\text{IC}_{50} = 39 \mu\text{M}$), TRK-B ($\text{IC}_{50} = 49 \mu\text{M}$) und VEGF-R2 ($\text{IC}_{50} = 66 \mu\text{M}$). In Tabelle 7-15, Kapitel 7.3.1 sind sämtliche ermittelten IC_{50} -Werte aufgeführt.

Ein Grund für die geringe inhibitorische Aktivität gegenüber den untersuchten Kinasen kann in der geringen Löslichkeit der Pyridopyrimidine **24-27a-b** liegen. Dieses Phänomen wird auch für andere Verbindungsklassen beschrieben, welche das Pyridopyrimidin-Strukturelement zeigen.¹⁵¹ Zukünftige Strukturmodifikationen sollten demnach zum Ziel haben, die Löslichkeit der Verbindungen zu erhöhen.

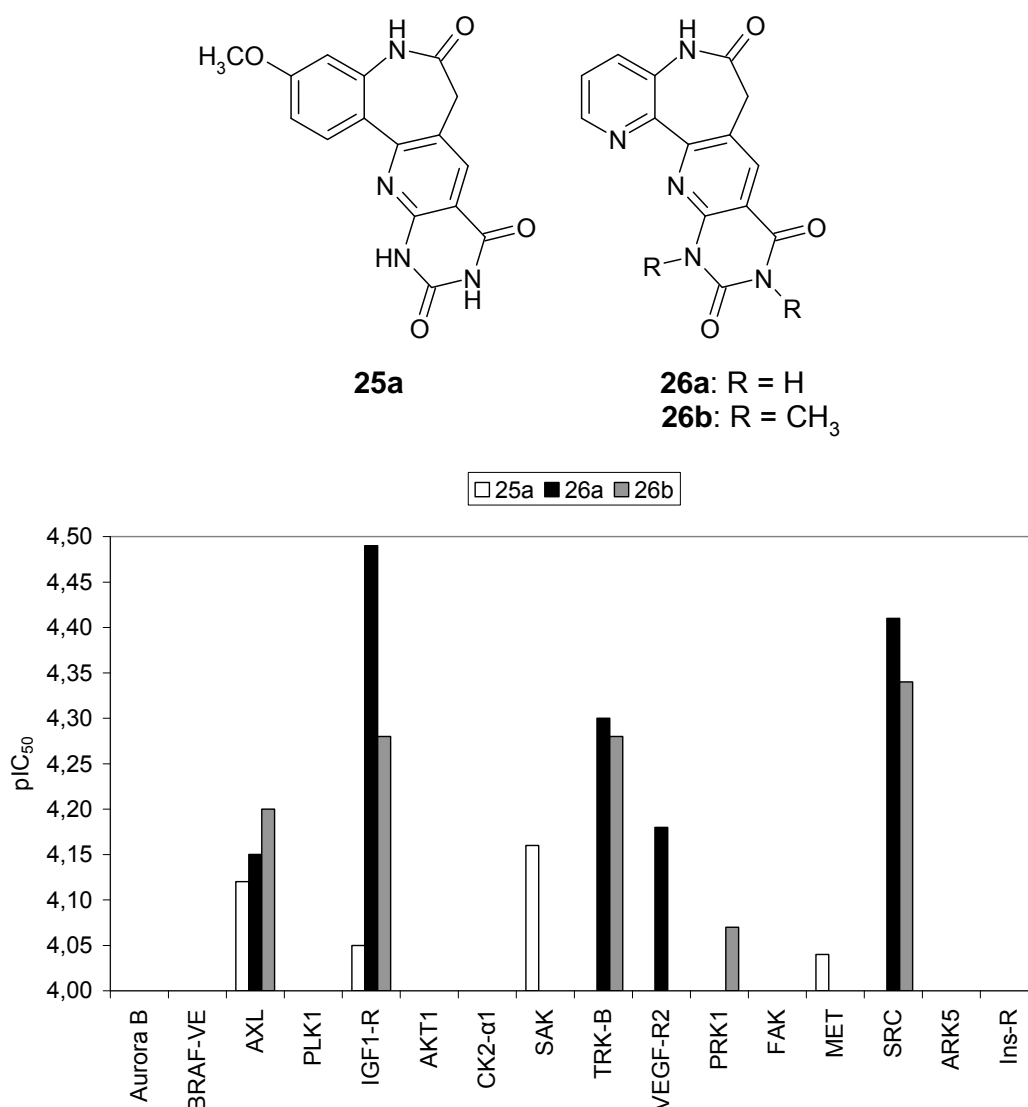


Abbildung 4-17: pIC_{50} -Werte von **25a** und **26a-b** an 16 Kinasen
Nicht dargestellte Säulen zeigen pIC_{50} -Werte < 4.0 an.

4.6 Kinaseinhibitorische Aktivität der weiteren *d*-anellierten 1-Benzazepinone und azaanaloger Verbindungen

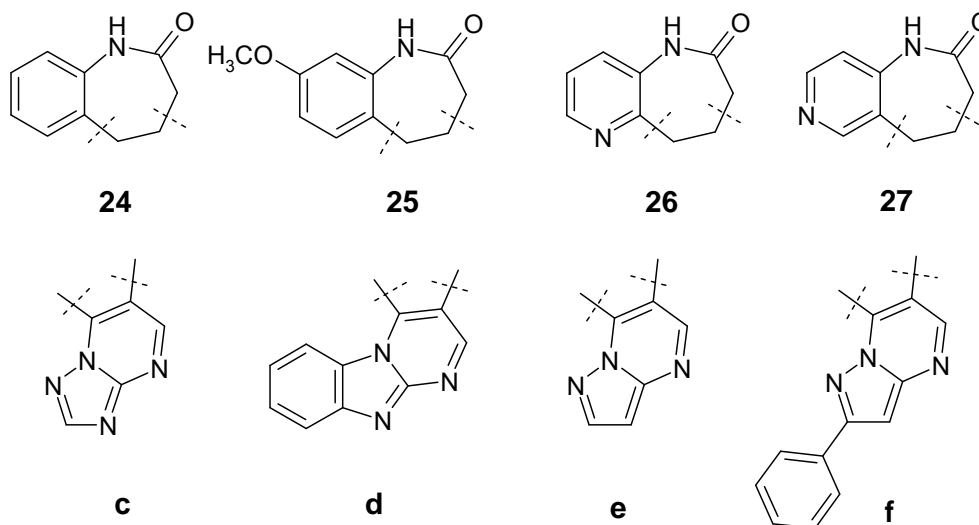
Von den *d*-anellierten 1-Benzazepinonen **25c-f** sowie von den Azaderivaten **26c-f** und **27f** wurden ebenfalls IC₅₀-Werte an 16 Kinasen von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, ermittelt. Diese werden im Folgenden mit den IC₅₀-Werten verglichen, die Dunkel für die Strukturanaloga **24e-f** beschreibt.⁶⁵

Insgesamt zeigten die hier vorgestellten Derivate IC₅₀-Werte im mikromolaren Bereich. Inhibiert wurden vor allem die Kinasen VEGF-R2, FAK, SRC, IGF1-R und TRK-B (Tabelle 4-7). Die essentielle Insulin-Rezeptor Kinase INS-R wurde von einer Verbindung gehemmt, und zwar von **25f** bei einem IC₅₀-Wert von 11 µM. Wie in Tabelle 4-7 dargestellt, zeigte das 10-Methoxy-Derivat **25e** niedrigere IC₅₀-Werte an den betrachteten Kinasen als **24e**. Die Azaverbindung **26e** dagegen war insgesamt weniger aktiv als die übrigen Pyrazolopyrimidine.

Stärker wirkten sich die Strukturmodifikationen bei den Phenylpyrazolopyrimidinen aus. Dunkel beschreibt für **24f** eine selektive Inhibition von VEGF-R2 und VEGF-R3, während **24f** für die anderen hier betrachteten Kinasen IC₅₀-Werte über 100 µM zeigt. Durch Einführung einer Methoxygruppe in 10-Position wurden IC₅₀-Werte im niedrig mikromolaren Bereich für VEGF-R2, FAK, SRC sowie IGF1-R gefunden. **25f** kann demnach im Vergleich zur selektiven Verbindung **24f** als Multikinase-Inhibitor bezeichnet werden, wobei VEGF-R2 nach wie vor am stärksten gehemmt wird. Auch die Azaderivate **26f** und **27f** inhibierten eine größere Anzahl an Kinasen, allerdings waren sie schwächer aktiv als 10-Methoxy-2-phenyl-6,8-dihydro-7*H*-pyrazolo-[5',1':2,3]pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-7-on (**25f**). Auch **26f** und **27f** zeigten gegenüber VEGF-R2 die stärkste Hemmwirkung.

Die Triazole **25c** und **26c** sowie die Benzimidazol-Verbindungen **25d** und **26d** waren gegenüber VEGF-R2 und FAK nicht aktiv. SRC und IGF1-R wurden im mikromolaren Bereich inhibiert (Tabelle 4-7). Eine vollständige Beschreibung der IC₅₀-Werte für alle getesteten Kinasen folgt in Tabelle 7-16, Kapitel 7.3.1.

Tabelle 4-7: IC₅₀-Werte der *d*-anellierten 1-Benzazepinone **25c-f** und der aza-analogen Verbindungen **26c-f** und **27f** an ausgewählten Kinasen^a



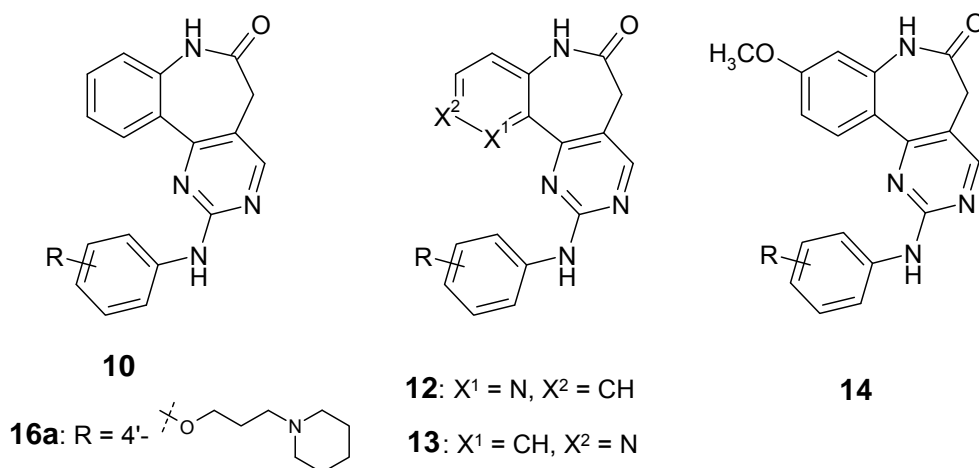
| | VEGF-R2 | FAK | SRC | IGF1-R | cLogP ^b |
|------------|---------|-----|-----|--------|--------------------|
| 24e | 12 | 62 | 29 | 86 | 1.33 ± 0.81 |
| 24f | 0.63 | | | | 3.10 ± 1.25 |
| 25c | | | 41 | 95 | 0.50 ± 0.86 |
| 25d | | 100 | 63 | 82 | 2.65 ± 1.31 |
| 25e | 8.6 | 49 | 23 | 59 | 1.50 ± 0.83 |
| 25f | 1.8 | 12 | 6.2 | 6.1 | 3.27 ± 1.26 |
| 26c | | | 59 | 63 | -0.49 ± 0.85 |
| 26d | | | 89 | 66 | 1.66 ± 1.30 |
| 26e | 87 | 87 | 71 | 74 | 0.50 ± 0.82 |
| 26f | 16 | 90 | 63 | 72 | 2.28 ± 1.25 |
| 27f | 2.0 | 66 | 43 | | 2.61 ± 1.26 |

^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 µM gleichzusetzen.

^b Die cLogP-Werte wurden mit dem Programm ACD/LogP Freeware (Version 11.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) berechnet.

5 Zusammenfassung

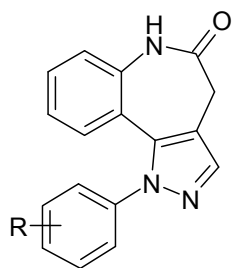
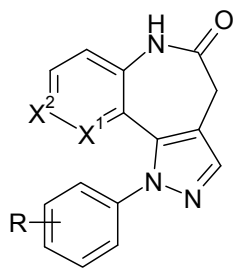
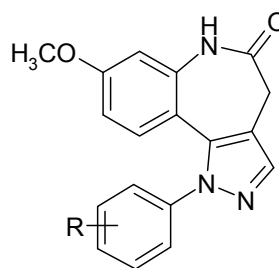
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neuartige *d*-anellierte 1-Benzazepinone und die entsprechenden azaanalogen Verbindungen ausgehend von Enaminonen synthetisiert und ihre kinaseinhibitorische und antiproliferative Aktivität untersucht.



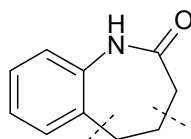
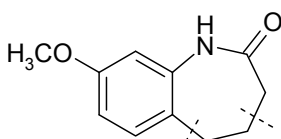
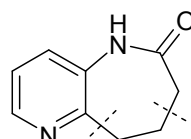
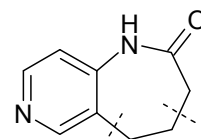
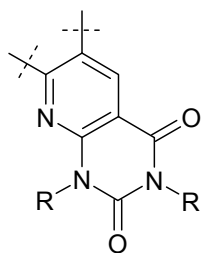
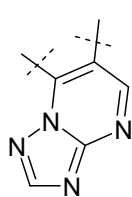
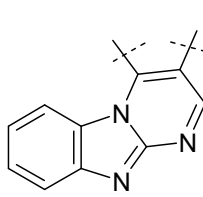
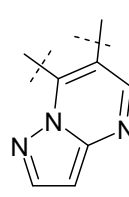
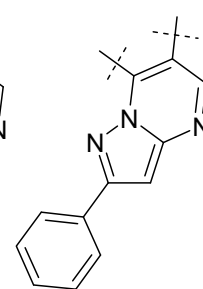
Die Substanzklasse der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **10** wurde um die 11- und 10-Azaderivate **12** und **13** sowie um die 9-Methoxy-Verbindungen **14** erweitert. Während **12** deutlich schwächere Aktivität an 15 tumorrelevanten Kinasen zeigte, erwies sich **13** gegenüber **10** als ähnlich aktiv. Die Einführung eines Methoxysubstituenten bei **14** führte zu einer deutlichen Steigerung der kinaseinhibitorischen Wirkung. Vor allem VEGF-R2, Aurora B, PLK-1, FAK und SRC wurden im submikro- bis nanomolaren Bereich gehemmt. Die 4'-Piperidinpropoxy-substituierte Verbindung **16a** zeigte ebenfalls eine gesteigerte Inhibition der genannten Kinasen im Vergleich zu **10a** (R = 4'-OH).

Die Verbindungen **14d** (R = 4'-OC₂H₅) und **14e** (R = 3'-Cl, 4'-OH) wirkten auch in einem zellulären Autophosphorylierungs-Assay an humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene stärker inhibitorisch gegenüber VEGF-R2 als die Leitverbindungen **10**. Die Sprossung von endothelialen Zellen wurde von **14d**, **14e** sowie **16a** in einem Sphäroid-basierten zellulären Angiogenese-Assay vermindert.

Einzelne Vertreter der Anilinopyrimidin-Gruppen wurden beim *National Cancer Institute* auf ihre antiproliferative Aktivität an 60 Tumorzelllinien untersucht. Von **13d** (R = 4'-OC₂H₅) und **14d** (R = 4'-OC₂H₅) wurden vor allem Nierenkrebs-Zelllinien inhibiert. Sie zeigten GI₅₀-Werte im niedrig mikro- bis nanomolaren Bereich.

**11****20:** X¹ = N, X² = CH**21:** X¹ = CH, X² = N**22**

Als weitere Substanzklasse wurden die Pyrazol-Derivate **20**, **21** und **22** synthetisiert. Während 1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **11** eine ausgeprägte antiproliferative Aktivität gegenüber Zelllinien des *National Cancer Institute* zeigten, führte die Einführung von Stickstoffatomen in das Molekülgrundgerüst bei **20** und **21** zu einem weitgehenden Verlust der wachstumshemmenden Wirkung auf Tumorzelllinien. Dagegen erwies sich das 8-Methoxyderivat **22b** (R = 3',5'-diCl) als stark antiproliferativ mit GI₅₀-Werten im nanomolaren Bereich.

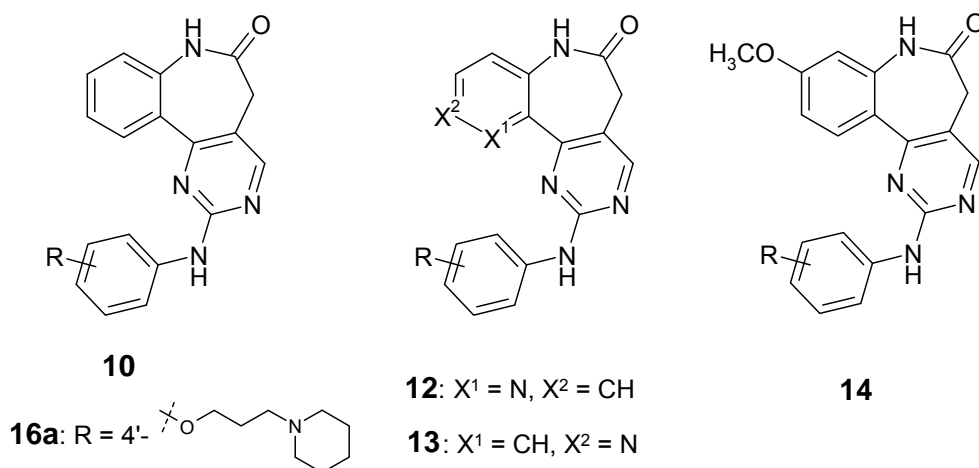
**24****25****26****27****a:** R = H**b:** R = CH₃**c****d****e****f**

Die neuartigen 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11-(10*H*)-trione **24a-b** und **25a-b** sowie die azaanalogen Verbindungen **26a-b** und **27a-b** konnten im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden. Durch Anwendung zweidimensionaler NMR-Methoden (HSQC, HMBC) gelang dabei die Unterscheidung zwischen verschiedenen möglichen Strukturisomeren. Die Verbindungen **24-27a,b** zeigten

ebenso wie die erstmals synthetisierten α -anellierten heterozyklischen Benzazepinone **25c-f** sowie deren Azaanaloga **26c-f** und **27f** an 15 tumorrelevanten Kinasen nur schwache Hemmeffekte.

6 Summary

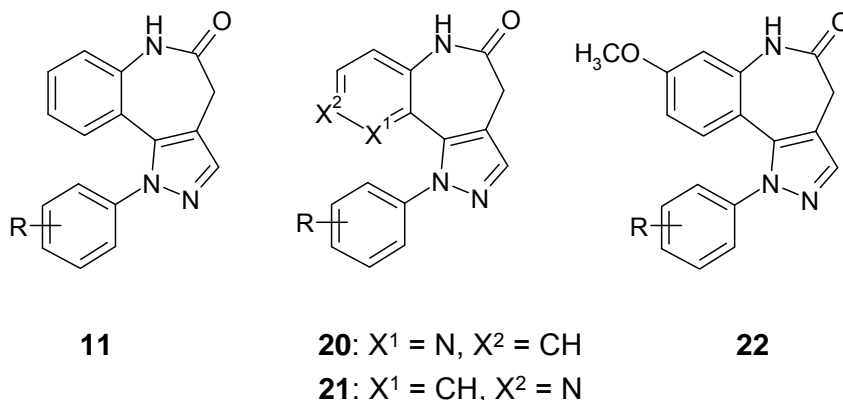
This thesis reports the synthesis of novel *d*-annulated 1-benzazepinones and azaanalogues thereof from enaminones and their kinase inhibitory and antiproliferative activity.



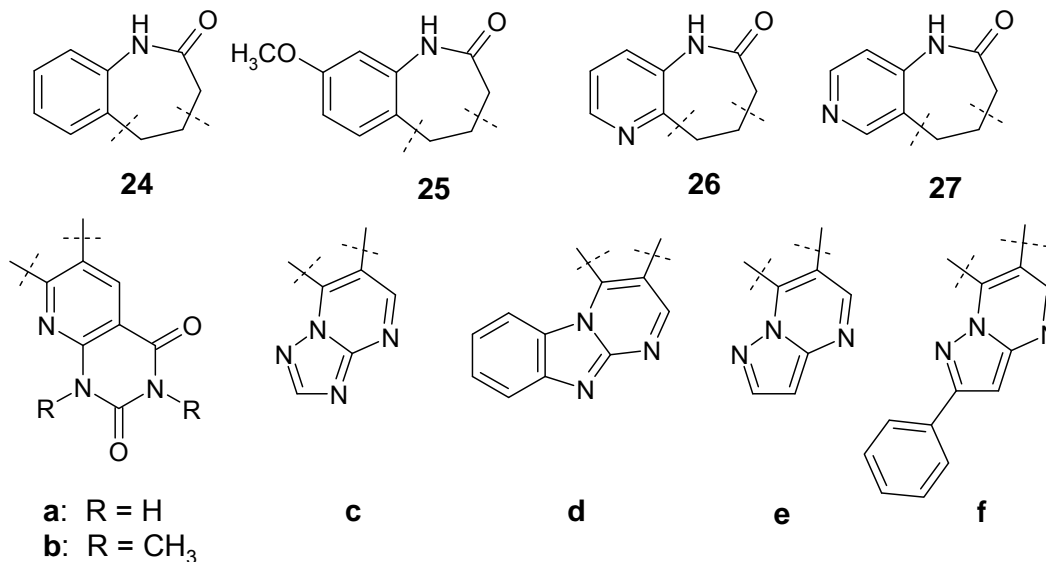
The class of 2-anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepine-6-ones **10** was enlarged by the 11- and 10-azaderivatives **12** and **13** as well as the 9-methoxy compounds **14**. Whereas **12** showed noticeably decreased activity towards 15 cancer-related kinases, **13** was approximately as active as **10**. The insertion of a methoxy substituent in **14** caused a significant increase in kinase inhibitory activity. Particularly VEGF-R2, Aurora B, PLK-1, FAK and SRC were inhibited in the submicromolar to nanomolar range. The 4'-piperidinylpropoxy-substituted compound **16a** also showed increased inhibition of the kinases mentioned above in comparison to **10a** ($R = 4'\text{-OH}$).

The compounds **14d** ($R = 4'\text{-OC}_2\text{H}_5$) and **14e** ($R = 3'\text{-Cl}, 4'\text{-OH}$) were also more effective in a VEGF-R2-specific phosphorylation assay in human umbilical vein endothelium cells than the lead structures **10**. Human umbilical vein endothelial cell sprouting was inhibited by **14d**, **14e** and **16a** in a spheroid-based cellular angiogenesis assay.

Some anilinopyrimidines were tested at the National Cancer Institute for their antiproliferative activity towards 60 tumor cell lines. **13d** ($R = 4'\text{-OC}_2\text{H}_5$) and **14d** ($R = 4'\text{-OC}_2\text{H}_5$) primarily inhibited renal cancer cell lines. They showed GI_{50} -values in the submicromolar to nanomolar range.



As another class of compounds the pyrazole-derivatives **20**, **21** and **22** were synthesised. Whereas 1-phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepine-5(1*H*)-ones **11** showed a distinct antiproliferative activity towards cell lines of the National Cancer Institute, the insertion of nitrogen atoms in the molecular structure of **20** and **21** caused extensive loss of the growth inhibitory effect towards tumor cell lines. In contrast the 8-methoxy derivative **22b** (R = 3',5'-diCl) turned out to be highly antiproliferative effective with GI₅₀-values in the nanomolar range.



The novel 7,12-dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepine-6,9,11-(10*H*)-triones **24a-b** and **25a-b** as well as the azaanalogue compounds **26a-b** and **27a-b** could be synthesised in the course of this work. The application of two-dimensional NMR-techniques (HSQC, HMBC) allowed to differentiate between

possible structural isomers. The compounds **24-27a,b** showed only weak kinase inhibitory activity.

Similar to the compounds **24-27a,b**, the novel *d*-annulated 1-benzazepinones **25c-f** and their azaanalogues **26c-f** and **27f** exhibited only weak inhibitory activity towards 15 tumor-relevant kinases.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Merck/Hitachi LaChrom Elite: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Trennsäule: LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 μm), Fa. Merck, Darmstadt.

Probenvorbereitung: ca. 1 mg Substanz wird in 500 μl DMSO gelöst und durch einen Acrodisc® MHP 13 μm -Filter filtriert; die Lösung wird anschließend mit DMSO 1:5 verdünnt.

Elution: Injektionsvolumen 10 μl ; Flussrate: 1.000 ml/min, isokratisch; Gesamtlaufzeit: 15 min; angestrebte Gesamtretentionszeit ($t_{\text{m+s}}$): 3-8 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril oder Methanol mit bidestilliertem Wasser oder $(\text{Et}_3\text{NH})_2\text{SO}_4$ -Puffer (pH 2.5) im jeweils angegebenen Verhältnis; Herstellung $\text{H}_2\text{O}+(\text{Et}_3\text{NH})_2\text{SO}_4$ (pH 2.5): 20 ml Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid werden mit bidestilliertem Wasser zu 1000 ml gelöst und mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.5 eingestellt.

Detektion: DAD bei 254 und 280 nm; angestrebte Absorption: 300-1000 mAU, gegebenenfalls Anpassung der Probenkonzentration;

Auswertung: 100%-Methode; Angabe der Absorptionsmaxima (λ_{max}) entsprechend den Peakmaxima, die in den mittels DAD gewonnenen UV-Spektren angezeigt wurden; Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3; Integrationsausschluss: 1.55 min, Threshold 500; Bestimmung der Nettoretentionszeit (t_{s}) und Totzeit (t_{m}) bezogen auf DMSO.

cLogP-Werte

Die cLogP-Werte wurden mit dem Programm ACD/LogP Freeware (Version 11.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) ermittelt. Dazu wurden die Strukturen zunächst mit ChemSketch 11.0 Freeware (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2008) gezeichnet. Die cLogP-Werte wurden anschließend mit dem LogP-Algorithmus Version 10.0 berechnet. Die cLogP-Werte beruhen auf einer

Datenbank von über 18000 experimentell bestimmten LogP-Werten von Molekülfragmenten. Die Angabe der cLogP-Werte erfolgt mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die zuverlässigsten Vorhersagen werden für neutrale Substanzen erhalten. Für geladene Verbindungen werden durch das Programm keine cLogP-Werte angegeben, vielmehr erfolgt ein Verweis auf die Möglichkeit, den cLogD-Wert berechnen zu lassen.

Dünnschichtchromatographie

DC-Mikrokarten Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion unter UV-Licht bei 254 und 366 nm.

Elementaranalysen

CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

IR-Spektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200 (vermessen als KBr-Pressling), Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 (¹H-NMR-Messung: 400 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance 600 (¹H-NMR-Messung: 600 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 150.9 MHz) (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig);

Interner Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala;

¹H-NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration; Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett;

¹³C-NMR: Der Zusatz (2C) weist auf ein überlagertes Signal isochroner Kohlenstoff-Atome hin. Die Spektren wurden ¹H-breitbandentkoppelt aufgenommen und zusätzlich eine ¹³C-DEPT135-Messung durchgeführt.

Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig); Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS; hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard Perfluorokerosin. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben zu hochaufgelösten Massenspektren auf das Molekül-Radikal-Kation ($M^{\cdot+}$).

Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover; Chem Driver™ Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 ml mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

Röntgenkristallstruktur-Analysen

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung vermessen.

Strukturauflösung: direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: siehe Kapitel 7.2 Synthesen und analytische Daten (Röntgenographische Daten).

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 Å (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt; Säulendurchmesser 2.5 cm, Füllhöhe 30 cm.

Schmelzpunkte

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

Trocknung von Lösungsmitteln

Die Trocknung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte nach publizierten Methoden.¹⁵²

Ethanol: Zur Reinigung und Trocknung wird absolutierter Ethanol (min. 99.5%) in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler mit Metallwendel (!) vorgelegt und ca. 7-10 g Natrium*-Schnitzel pro Liter portionsweise unter Stickstoffbegasung hinzugefügt. Es wird solange erhitzt, bis sich das Natrium vollständig gelöst hat. Anschließend werden ca. 30 g/l Phthalsäurediethylester hinzu gegeben und die Mischung wird für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Der Rückflusskühler wird durch einen absteigenden Liebigkühler ersetzt und der getrocknete Ethanol abdestilliert, wobei ein Vorlauf von 20 ml verworfen wird. Nach der Destillation wird der getrocknete Ethanol über regeneriertem Molekularsieb (3Å) gelagert.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

Toluen: 1.5 l Toluol werden in einem 2l-Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr zum Rückfluss erhitzt. Das Kondensat im Wasserabscheider wird so lange abgelassen, bis es nicht mehr getrübt ist. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden ca. 15 g Calciumchlorid hinzugefügt und es wird ein Tropftrichter mit Druckausgleich zwischen Rundkolben und Kühler integriert. Bei geöffnetem Hahn wird so 2-3 h zum Rückfluss erhitzt. Durch Schließen des Hahnes wird schließlich das getrocknete Toluol im Tropftrichter aufgefangen. Dabei sollte das Calciumchlorid stets von einer Toluolschicht bedeckt bleiben. Alternativ kann auch an einer Rundlaufapparatur über Calciumchlorid getrocknet werden. Das getrocknete Toluol wird über regeneriertem Molekularsieb (4Å) gelagert.

7.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **10** und **14** sowie der azaanalogen Verbindungen **12** und **13**

Methode A:

1.00 mmol des entsprechenden 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions **46** bzw. **49** oder der azaanalogen Verbindung **47** bzw. **48** wird mit 1.20 mmol des jeweiligen *N*-Phenylguanidiniumnitrats **51** und 1.2 mmol (48 mg) Natriumhydroxid in 5 ml 2-Propanol für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

Methode B:

1.00 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) wird mit 1.20 mmol des jeweiligen *N*-Phenylguanidiniumnitrats **51** und 1.2 mmol (48 mg) Natriumhydroxid in 5 ml 2-Propanol in einem geschlossenen Reaktionsgefäß (Volumen 10 ml) für 30-40 min bei 150 °C in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck 300 Psi) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **22** und der azaanalogen Verbindungen **20** und **21**

1.00 mmol 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) oder der azaanalogen Verbindung **47** bzw. **48** wird mit 1.50 mmol eines Phenylhydrazinhydrochlorids* **67** und 1.50 mmol (123 mg) Natriumacetat in 10 ml Eisessig für 1 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz in 20 ml 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese der 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11(10*H*)-trione **24a-b** und **25a-b** sowie der azaanalogen Verbindungen **26a-b** und **27a-b**

1.00 mmol des entsprechenden 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions **46** bzw. **49** oder der azaanalogen Verbindung **47** bzw. **48** wird mit 1.00 mmol des jeweiligen 6-Aminouracil-Derivats in 8 ml Eisessig bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 30 ml 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung gegossen und weiter gekühlt. Ein entstehender Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Synthese der anellierten Stickstoff-haltigen Heterozyklen **25c-f**, **26c-f** und **27f**

1.00 mmol 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) bzw. der azaanalogen Verbindung **47** bzw. **48** wird mit 1.02 mmol eines fünfgliedrigen Stickstoffheterozyklus (**91-94**) in 3-4 ml Eisessig in einem geschlossenen Reaktionsgefäß (Volumen 10 ml) für 10-30 min bei 120 °C bzw. 140 °C in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck 300 Psi) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 30 ml 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung gegossen und der pH-Wert mit 10%iger Natriumhydroxid-Lösung auf 6-7 eingestellt. Die Lösung wird weiter gekühlt. Bleibt eine Niederschlagsbildung aus, wird die Lösung mit 4 x 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum eingeeengt und der Rückstand wird wiederum aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese des 2-[4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylesters (**30**) und der analogen (4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)aminopyridincarbonsäureethylester **35** und **40**

Methode A:

10.00 mmol des entsprechenden Aminocarbonsäureesters **28**, **34** bzw. **39** werden in 1.2 ml Pyridin und 15 ml Toluol (trocken) suspendiert. Unter Rühren und Kühlen werden 12.50 mmol (2057 mg) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) in 5 ml Toluol (trocken) langsam zugetropft. Anschließend wird bis zur vollständigen Umsetzung (ca. 2 h) zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird in einen Scheidetrichter überführt und die organische Phase zunächst mit 10 ml Wasser, dann je zweimal mit 10 ml 10%iger Salzsäure und 10 ml 7%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließend erneut mit 10 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird im Vakuum bis zur Trockne eingedampft.

Methode B:

10.00 mmol des entsprechenden Aminocarbonsäureesters **28**, **34** bzw. **39** werden mit 20.00 mmol (2018 mg) Calciumcarbonat in 25 ml Toluol (trocken) im Eisbad gerührt. 12.50 mmol (2057 mg) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) in 25 ml Toluol (trocken) werden langsam zugetropft. Anschließend wird bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird heiß filtriert und im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird in 40 ml Ethylacetat gelöst und dreimal mit je 30 ml 7%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Abschließend wird die organische Phase einmal mit Wasser gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat erneut im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Synthese des 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (31) sowie der azaanalogen Verbindungen 36 und 41

Alle Arbeitsschritte werden unter Stickstoffbegasung und unter Benutzung von getrockneten Lösungsmitteln sowie eines Rückflusskühlers mit Metallwendel durchgeführt!

50.00 mmol (2005 mg) Kaliumhydrid* (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) werden dreimal mit je 5 ml Toluol gewaschen und anschließend in 4 ml Toluol suspendiert. Die Suspension wird im vorgekühlten Silikonölbad gerührt. Man löst 10.00 mmol des entsprechenden (4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)aminocarbonsäureethylesters **30**, **35** bzw. **40** in 4.5 ml *N,N*-Dimethylformamid und 30 ml Toluol und lässt diese Lösung sehr langsam zur gekühlten Kaliumhydrid-Suspension tropfen. Bis zur vollständigen Beendigung der Gasentwicklung wird bei Raumtemperatur und anschließend bei 70-75 °C bis zur vollständigen Umsetzung gerührt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und der vollständigen Umsetzung des Kaliumhydrids (keine Reste mehr sichtbar!) werden vorsichtig 3 ml Eisessig bis zur neutralen Reaktion und dann ca. 30 ml Wasser zugetropft. Nach weiterer Kühlung wird der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser und Petrolether gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

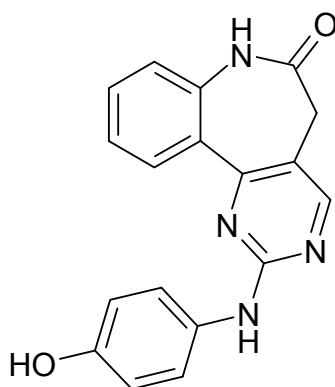
Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Synthese der 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **46** und **49** sowie der azaanalogen Verbindungen **47** und **48**

1.00 mmol des entsprechenden 1-Benzazepindions **32** bzw. **45** oder des jeweiligen Pyridoazepindions **37** bzw. **42** wird mit 3.5 ml (26 mmol) Dimethylformamid-Dimethylacetal für 2.5 h bei 115 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Petrolether gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV 8): Synthese der Arylguanidiniumnitrate **51a-f**

40 mmol des entsprechenden Anilin-Derivats* **50a-f** werden in 10 ml Ethanol 96% gerührt. Anschließend werden zunächst 3.6 ml konz. Salpetersäure (65%) und dann 5 ml einer 50%igen wässrigen Cyanamid-Lösung zugetropft. Das Gemisch wird für 18 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach dem Erkalten entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus 2-Propanol umkristallisiert. Bei Ausbleiben einer Niederschlagsbildung kann diese durch Kühlen und Gießen in 200 ml gekühlten Diethylether herbeigeführt werden. Der so entstandene Kristallbrei sollte zügig abgesaugt werden und dabei mit Ether bedeckt bleiben. Die Reinigung erfolgt ebenfalls durch Umkristallisation aus 2-Propanol.

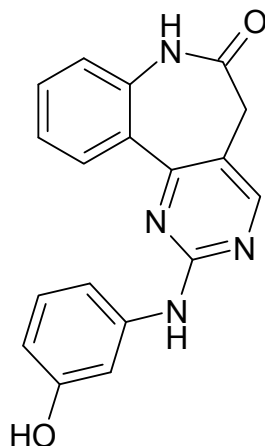
*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (**10a**)

Nach AAV 1, Methode B aus 230 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) und 257 mg (1.20 mmol) *N*-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51a**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 245 mg (77%) eines grünen Pulvers.

Schmp.: 358 °C (unter Zersetzung) (Lit.⁶¹: 356-357 °C)

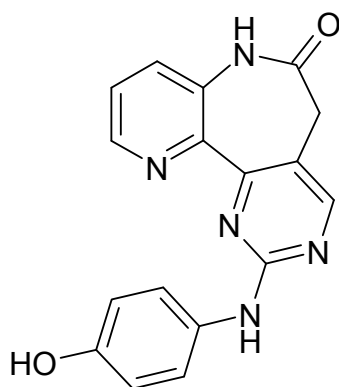
2-(3-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (**10b**)



Nach AAV 1, Methode B aus 230 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) und 257 mg (1.20 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51b**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 224 mg (70%) eines farblosen Pulvers.

Schmp.: 285 °C (Lit.⁶¹: 288-289 °C)

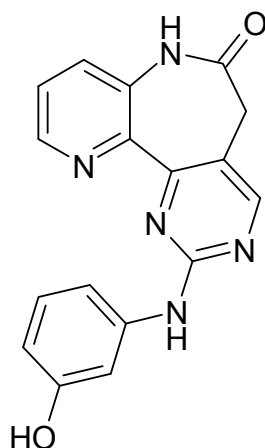
2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-b]pyrimido[4,5-d]azepin-6-on (**12a**)



Nach AAV 1, Methode A aus 116 mg (0.500 mmol) 8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**47**) und 129 mg (0.600 mmol) *N*-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51a**). Reaktionsdauer: 14 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 66 mg (41%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 310 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3430 cm⁻¹ und 3367 cm⁻¹ (NH), 3129 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2983 cm⁻¹ und 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1687 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.39 (s, 2H, CH₂), 6.67-6.70 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.57-7.59 (m, 3H, ArH), 7.63 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.5 Hz, ArH), 8.48 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.61 (dd, 1H, *J* = 4.1/1.5 Hz, ArH), 9.04 (s, 1H, OH), 9.58 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.2 (CH₂); 114.2 (2C), 120.0 (2C), 124.5, 129.3, 144.7, 156.8 (tert. C); 116.9, 131.5, 134.8, 144.6, 151.4, 159.3, 159.4, 171.2 (quart. C); C₁₇H₁₃N₅O₂ [319.32]; ber. C 63.94, H 4.10, N 21.93; gef. C 63.20, H 4.20, N 21.37; HRMS-El (m/z): [M-H]⁺ ber. 318.09912, gef. 318.09896; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; t_s: 2.60 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 15:85); λ_{max}: 258 nm; cLogP: 1.37 ± 0.50.

2-(3-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrido[3,2-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on (**12b**)

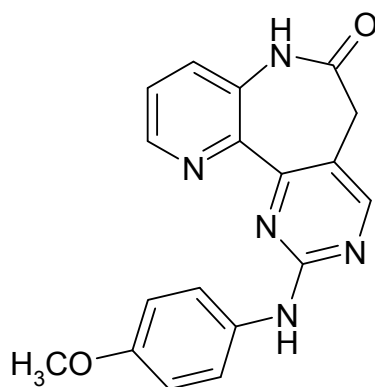


Nach AAV 1, Methode A aus 116 mg (0.500 mmol) 8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 129 mg (0.600 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51b**). Reaktionsdauer: 14 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 92 mg (58%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 350 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3308 cm⁻¹ und 3205 cm⁻¹ (NH), 3139 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2972 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1681 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.43 (s, 2H, CH₂), 6.37 (ddd, 1H, *J* = 7.9/2.4/0.9 Hz,

ArH), 7.03 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 7.28-7.30 (m, 1H, ArH), 7.36 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz, ArH), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.3/4.2$ Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, $J = 8.3/1.7$ Hz, ArH), 8.56 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.61 (dd, 1H, $J = 4.2/1.6$ Hz, ArH), 9.22 (s, 1H, OH), 9.76 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.0 (CH_2); 105.9, 108.5, 109.8, 125.3, 129.0, 130.0, 145.1, 157.5 (tert. C); 118.4, 135.6, 141.7, 145.4, 159.7, 160.1, 171.8 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$ [319.33]; ber. C 63.94, H 4.10, N 21.93; gef. C 62.11, H 4.58, N 20.68; HRMS-EI (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^+$ ber. 318.09912, gef. 318.09915; HPLC: Reinheit: 99.5% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm; t_s : 4.96 min, $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min (ACN: $\text{H}_2\text{O}+(\text{Et}_3\text{NH})_2\text{SO}_4$ 15:85); λ_{max} : 275 und 288 nm; cLogP: 1.76 ± 0.51 .

2-(4-Methoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on (12c)

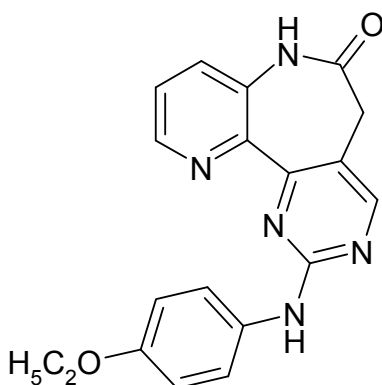


Nach AAV 1, Methode A aus 139 mg (0.600 mmol) 8-[(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 164 mg (0.720 mmol) *N*-(4-Methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51c**). Reaktionsdauer: 16 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 100 mg (50%) grüne Kristalle.

Schmp.: 256 °C; IR (KBr): 3265 cm^{-1} und 3202 cm^{-1} (NH), 3120 cm^{-1} (CH aromatisch), 2963 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1679 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.42 (s, 2H, CH_2), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.85-6.89 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.2/4.3$ Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, $J = 8.0/1.6$ Hz, ArH), 7.73-7.75 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.51 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.61 (dd, 1H, $J = 4.2/1.6$ Hz, ArH), 9.68 (s, 1H, NH), 10.28 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.1 ($-\text{OCH}_3$); 36.0 (CH_2); 113.7 (2C),

120.3 (2C), 125.2, 130.0, 145.4, 157.5 (tert. C); 117.9, 133.8, 135.5, 145.2, 154.1, 159.8, 160.1, 171.8 (quart. C); $C_{18}H_{15}N_5O_2$ [333.35]; ber. C 64.86, H 4.54, N 21.01; gef. C 64.00, H 4.54, N 20.42; HRMS-EI (m/z): ber. 333.12259, gef. 333.12286; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; t_s : 3.17 min, t_m (DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 25:75); λ_{max} : 280 nm; cLogP: 2.06 ± 0.51 .

2-(4-Ethoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-b]pyrimido[4,5-d]azepin-6-on (12d)

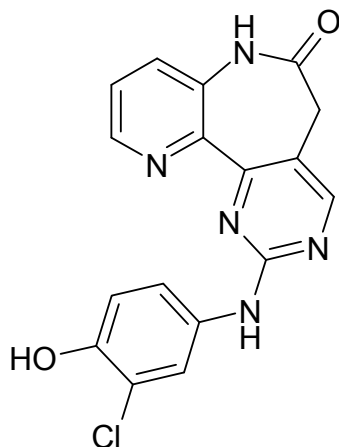


Nach AAV 1, Methode A aus 90 mg (0.40 mmol) 8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**47**) und 116 mg (0.480 mmol) *N*-(4-Ethoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51d**). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 67 mg (48%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 248 °C; IR (KBr): 3308 cm⁻¹ und 3205 cm⁻¹ (NH), 3139 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2972 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1681 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, J = 7.1 Hz, -OCH₂CH₃), 3.41 (s, 2H, CH₂), 3.98 (q, 2H, J = 6.9, -OCH₂CH₃), 6.83-6.87 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.58 (dd, 1H, J = 8.2/4.0 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, J = 8.2/1.8 Hz, ArH), 7.71-7.75 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.51 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.61 (dd, 1H, J = 4.5/1.3 Hz, ArH), 9.68 (s, 1H, NH), 10.28 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 14.7 (-OCH₂CH₃); 36.0 (CH₂), 63.1 (-OCH₂CH₃); 114.3 (2C), 120.3 (2C), 125.2, 130.0, 145.2, 157.5 (tert. C); 117.9, 133.7, 135.5, 145.4, 153.3, 159.8, 160.1, 171.8 (quart. C); $C_{19}H_{17}N_5O_2$ [347.38]; ber. C 65.70, H 4.93, N 20.16; gef. C 63.15, H 4.71, N 19.19; HRMS-EI (m/z): ber. 347.13824, gef. 347.13793; HPLC: Reinheit: 100.0%

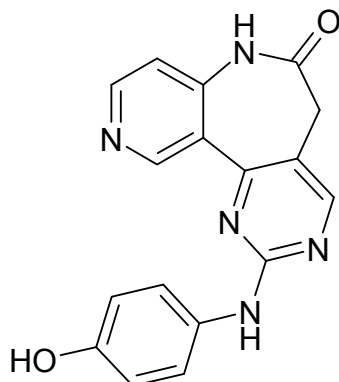
bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; t_s : 3.38 min, $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70); λ_{max} : 281 nm; cLogP: 2.59 ± 0.51 .

2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[3,2-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on
(12e)



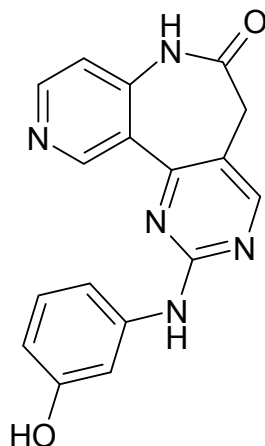
Nach AAV 1, Methode A aus 116 mg (0.500 mmol) 8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 147 mg (0.600 mmol) *N*-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51e**). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 45 mg (25%) grüne Kristalle.

Schmp.: 300 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3386 cm⁻¹ und 3287 cm⁻¹ (NH), 3109 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2905 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.42 (s, 2H, CH₂), 6.89 (d, 1H, J = 8.8 Hz, ArH), 7.53 (dd, 1H, J = 8.8/2.3 Hz, ArH), 7.59 (dd, 1H, J = 8.3/4.4 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, J = 8.5/1.4 Hz, ArH), 7.99 (s (breit), 1H, ArH), 8.55 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.61 (dd, 1H, J = 4.2/1.4 Hz, ArH), 9.71 (s, 1H, OH), 9.80 (s, 1H, NH), 10.33 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.9 (CH₂); 116.3, 118.7, 119.9, 125.3, 129.9, 145.4, 157.6 (tert. C); 118.0, 118.9, 133.2, 135.5, 144.9, 147.4, 159.5, 160.0, 171.7 (quart. C); C₁₇H₁₂ClN₅O₂ [353.77]; ber. C 57.72, H 3.42, N 19.80; gef. C 56.19, H 3.33, N 18.41; HRMS-EI (*m/z*): ber. 353.06796, gef. 353.06714; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; t_s : 3.28 min, $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 20:80); λ_{max} : 279 nm; cLogP: 2.36 ± 0.52 .

2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[4,3-b]pyrimido[4,5-d]azepin-6-on (13a)

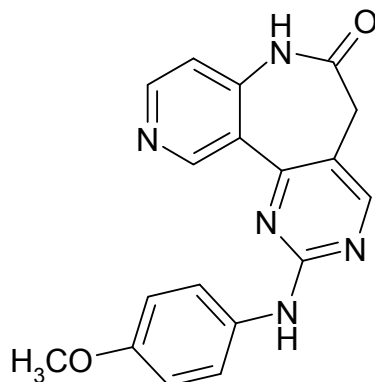
Nach AAV 1, Methode A aus 139 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**48**) und 154 mg (0.720 mmol) *N*-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51a**). Reaktionsdauer: 24 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 116 mg (60%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 317 °C; IR (KBr): 3399 cm⁻¹ (NH), 3185 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2949 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1684 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH₂), 6.71-6.73 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.17 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 7.51-7.54 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.47 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.58 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 9.10 (s, 1H, OH), 9.13 (s, 1H, ArH), 9.49 (s, 1H, NH), 10.68 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.0 (CH₂); 113.7 (2C), 114.2, 119.9 (2C), 149.7, 149.8, 156.7 (tert. C); 115.0, 122.3, 130.6, 143.2, 151.2, 157.4, 158.4, 170.3 (quart. C); C₁₇H₁₃N₅O₂ [319.32]; ber. C 63.94, H 4.10, N 21.93; gef. C 63.65, H 4.13, N 21.59; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; t_s: 5.60 min, t_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 25:75); λ_{max}: 233, 267 und 356 nm; cLogP: 1.70 ± 0.51.

2-(3-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[4,3-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on (**13b**)

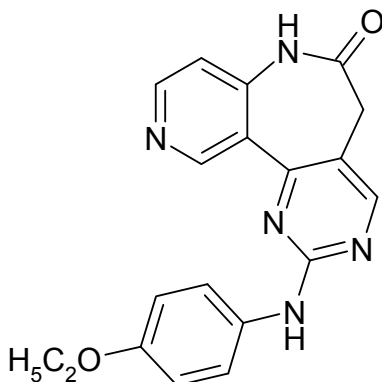
Nach AAV 1, Methode A aus 139 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) und 154 mg (0.720 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51b**). Reaktionsdauer: 30 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 66 mg (34%) farblose Kristalle.

Schmp.: 340 °C; IR (KBr): 3420 cm⁻¹ und 3262 cm⁻¹ (NH), 3054 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2871 cm⁻¹, 2731 cm⁻¹ und 2609 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1707 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.49 (s, 2H, CH₂), 6.39 (ddd, 1H, *J* = 8.0/2.4/0.8 Hz, ArH), 7.07 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.18 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 7.19-7.20 (m, 1H, ArH), 7.36 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz, ArH), 8.55 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.60 (d, 1H, *J* = 5.8 Hz, ArH), 9.19 (s, 1H, ArH), 9.35 (s (breit), 1H, OH), 9.72 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH₂); 105.9, 108.7, 109.8, 115.4, 129.0, 151.0, 151.3, 157.9 (tert. C); 117.0, 123.4, 141.3, 144.5, 157.5, 158.6, 159.3, 171.4 (quart. C); C₁₇H₁₃N₅O₂ [319.33]; ber. C 63.94, H 4.10, N 21.93; gef. C 62.67, H 4.23, N 21.06; HRMS-EI (*m/z*): [M-H]⁺ ber. 318.09912, gef. 318.09827; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; *t*_s: 5.11 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70); λ_{max}: 229, 274 und 355 nm; cLogP: 2.09 ± 0.52.

2-(4-Methoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[4,3-b]pyrimido[4,5-d]azepin-6-on (**13c**)

Nach AAV 1, Methode A aus 139 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**48**) und 164 mg (0.720 mmol) *N*-(4-Methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51c**). Reaktionsdauer: 16 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 97 mg (49%) grüne Kristalle.

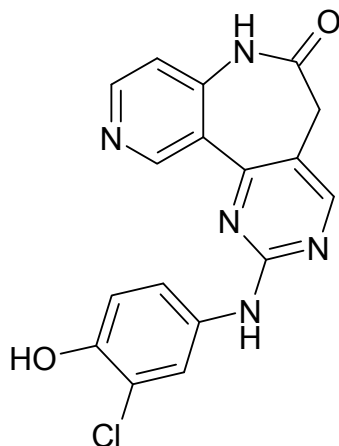
Schmp.: 275 °C; IR (KBr): 3427 cm⁻¹ und 3262 cm⁻¹ (NH), 3113 cm⁻¹ und 3045 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2939 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1686 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.47 (s, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 6.90-6.92 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.17 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 7.67-7.69 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.50 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.59 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 9.15 (s, 1H, ArH), 9.64 (s, 1H, NH), 10.69 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.1 (-OCH₃); 36.2 (CH₂); 113.7 (2C), 115.4, 120.6 (2C), 150.9, 151.0, 157.9 (tert. C); 116.5, 123.5, 133.4, 144.5, 154.2, 158.6, 159.5, 171.5 (quart. C); C₁₈H₁₅N₅O₂ [333.35]; ber. C 64.86, H 4.54, N 21.01, gef. C 64.65, H 4.50, N 20.65; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; t_s: 5.53 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 15:85); λ_{max}: 233, 269 und 356 nm; cLogP: 2.39 ± 0.52.

2-(4-Ethoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[4,3-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on (13d)

Nach AAV 1, Methode A aus 139 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) und 174 mg (0.720 mmol) *N*-(4-Ethoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51d**). Reaktionsdauer: 12 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 60 mg (29%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 276 °C; IR (KBr): 3264 cm⁻¹ und 3183 cm⁻¹ (NH), 3047 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2932 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1696 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.32 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, -OCH₂CH₃), 3.46 (s, 2H, CH₂), 3.99 (q, 2H, *J* = 6.9, -OCH₂CH₃), 6.87-6.91 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.17 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 7.64-7.68 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.50 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.59 (d, 1H, *J* = 5.8 Hz, ArH), 9.15 (s, 1H, ArH), 9.62 (s, 1H, NH, Signal nach D₂O-Zugabe gelöscht), 10.68 (s, 1H, NH, Signal nach D₂O-Zugabe gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 14.3 (-OCH₂CH₃); 35.8 (CH₂), 62.6 (-OCH₂CH₃); 113.8 (2C), 115.0, 120.2 (2C), 150.5, 150.6, 157.5 (tert. C); 116.1, 123.1, 132.9, 144.1, 153.1, 158.2, 159.1, 171.1 (quart. C); C₁₉H₁₇N₅O₂ [347.38]; ber. C 65.70, H 4.93, N 20.16; gef. C 64.72, H 4.83, N 19.71; HRMS-EI (*m/z*): ber. 347.13824, gef. 347.13874; HPLC: Reinheit: 99.0% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm; *t*_s: 5.35 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 30:70); λ_{max}: 229, 252 und 279 nm; cLogP: 2.92 ± 0.52.

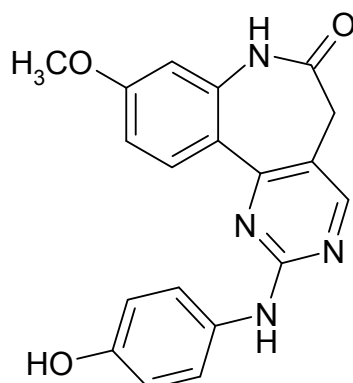
2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrido[4,3-*b*]pyrimido[4,5-*d*]azepin-6-on
(13e)



Nach AAV 1, Methode A aus 185 mg (0.800 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) und 240 mg (0.960 mmol) *N*-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51e**). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 100 mg (35%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 294 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3265 cm⁻¹ und 3198 cm⁻¹ (NH), 3115 cm⁻¹ und 3056 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2972 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1689 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.48 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.19 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 7.49 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.5 Hz, ArH), 7.89 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 8.53 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.60 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 9.16 (s, 1H, ArH), 9.66 (s, 1H, NH), 9.73 (s (breit), 1H, OH), 10.67 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.3 (CH₂); 115.4, 116.4, 119.3, 120.5, 151.0, 157.9 (tert. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); 116.8, 119.0, 123.4, 132.9, 144.5, 147.7, 158.7, 159.3, 171.4 (quart. C); C₁₇H₁₂ClN₅O₂ [353.77]; ber. C 57.72, H 3.42, N 19.80; gef. C 57.27, H 3.45, N 19.10; HRMS-EI (*m/z*): [M-H]⁺ ber. 352.06015, gef. 352.05897; HPLC: Reinheit: 99.7% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm; *t*_s: 3.11 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 20:80); λ_{max}: 232, 271 und 354 nm; cLogP: 2.69 ± 0.53.

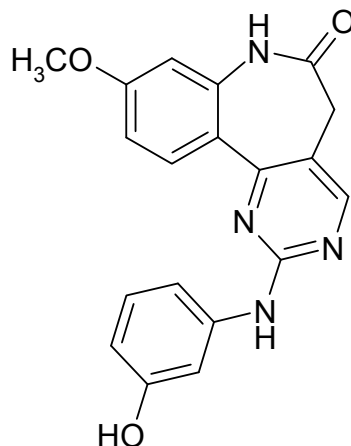
2-(4-Hydroxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(14a)



Nach AAV 1, Methode A aus 260 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 257 mg (1.20 mmol) *N*-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51a**). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 241 mg (69%) farblose Kristalle.

Schmp.: 349 °C; IR (KBr): 3260 cm⁻¹ und 3197 cm⁻¹ (NH; OH (breit) überdeckt), 3095 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2837 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 6.69-6.71 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, ArH), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.6/3.0 Hz, ArH), 7.52-7.54 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.98 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.02 (s, 1H, OH), 9.31 (s, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.0 (-OCH₃); 36.0 (CH₂); 105.9, 110.3, 114.5 (2C), 120.5 (2C), 131.0, 156.8 (tert. C); 115.2, 121.3, 131.8, 139.1, 151.8, 159.3, 160.0, 160.9, 171.0 (quart. C); C₁₉H₁₆N₄O₃ [348.36]; ber. C 65.51, H 4.63, N 16.08; gef. C 65.76, H 4.69, N 15.81; HPLC: Reinheit: 98.8% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm; *t*_s: 3.27 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70); λ_{max}: 245 und 283 nm; cLogP: 2.36 ± 0.52.

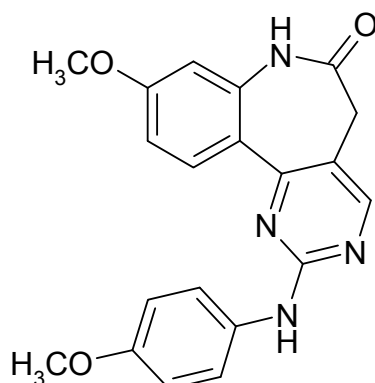
2-(3-Hydroxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(14b)



Nach AAV 1, Methode A aus 260 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 257 mg (1.00 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51b**). Reaktionsdauer: 16 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 149 mg (43%) beigefarbene Kristalle.

Schmp.: 280 °C; IR (KBr): 3270 cm⁻¹ und 3192 cm⁻¹ (NH), ca. 2800-3300 cm⁻¹ (OH, breit), 3100 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2929 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.36 (CH₂ vom Wasserpeak überlagert), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 6.37 (ddd, 1H, *J* = 8.0/2.3/0.9 Hz, ArH), 6.78 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 6.97 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.6 Hz, ArH), 7.05 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.20-7.23 (m, 1H, ArH), 7.36 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 8.44 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.25 (s (breit), 1H, OH), 9.54 (s, 1H, NH), 10.16 (s (breit), 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (-OCH₃); 36.4 (CH₂); 105.8, 106.4, 108.5, 109.7, 110.7, 129.0, 131.5, 157.1 (tert. C); 116.4, 121.6, 139.5, 141.7, 157.5, 159.4, 160.5, 161.4, 171.3 (quart. C); C₁₉H₁₆N₄O₃ [348.36]; ber. C 65.51, H 4.63, N 16.08; gef. C 65.02, H 4.53, N 15.47; HRMS-El (*m/z*): [M-H]⁺ ber. 347.11441, gef. 347.11385; HPLC: Reinheit: 99.7% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; *t*_s: 4.60 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 30:70); λ_{max}: 242 und 278 nm; cLogP: 2.75 ± 0.52.

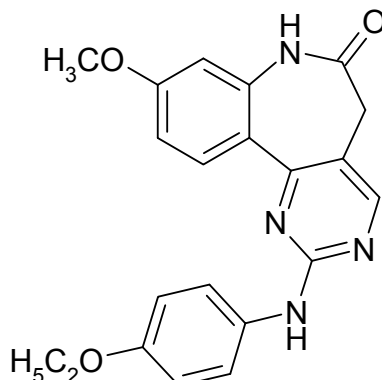
2-(4-Methoxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(14c)



Nach AAV 1, Methode A aus 156 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 164 mg (0.720 mmol) *N*-(4-Methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51c**). Reaktionsdauer: 18 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 122 mg (56%) hellgrüne Kristalle.

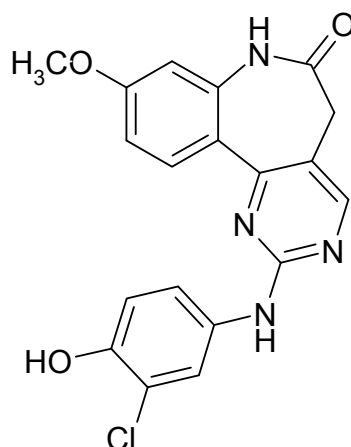
Schmp.: 288 °C; IR (KBr): 3268 cm⁻¹ und 3200 cm⁻¹ (NH), 3103 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2955 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, 2H, CH₂), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 6.76 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 6.88-6.89 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 6.96 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.6 Hz, ArH), 7.68-7.70 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 8.40 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.50 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.0 (-OCH₃), 55.4 (-OCH₃); 36.3 (CH₂); 106.3, 110.6, 113.6 (2C), 120.3 (2C), 131.3, 157.2 (tert. C); 115.8, 121.6, 133.7, 139.4, 154.0, 159.5, 160.4, 161.3, 171.3 (quart. C); C₂₀H₁₈N₄O₃ [362.39]; ber. C 66.29, H 5.01, N 15.46; gef. C 66.62, H 4.92, N 14.94; HRMS-EI (*m/z*): ber. 362.13788, gef. 362.13660; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; *t*_s: 4.46 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 40:60); λ_{max}: 245 und 284 nm; cLogP: 3.05 ± 0.52.

2-(4-Ethoxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(14d)



Nach AAV 1, Methode A aus 260 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 291 mg (1.20 mmol) *N*-(4-Ethoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51d**). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 280 mg (74%) farblose Kristalle.

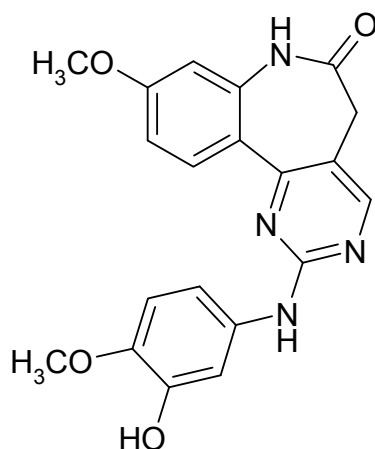
Schmp.: 267 °C; IR (KBr): 3257 cm⁻¹ und 3196 cm⁻¹ (NH), 3102 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2973 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1680 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, -OCH₂CH₃), 3.33 (CH₂ vom Wasserpeak überlagert), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 3.98 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, -OCH₂CH₃), 6.76 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, ArH), 6.84-6.88 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.5/2.6 Hz, ArH), 7.65-7.69 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.45 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 14.1 (-OCH₂CH₃), 55.7 (-OCH₃), 35.7 (CH₂), 62.3 (-OCH₂CH₃), 105.6, 110.0, 113.6 (2C), 119.7 (2C), 130.7, 156.5 (tert. C); 115.2, 120.9, 133.0, 138.8, 152.6, 158.9, 160.7, 170.7 (quart. C; ein C nicht detektiert bei 48 Scans); C₂₁H₂₀N₄O₃ [376.42]; ber. C 67.01, H 5.36, N 14.88; gef. C 67.36, H 5.30, N 14.57; HPLC: Reinheit: 96.3% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm; t_s: 2.92 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 50:50); λ_{max}: 245 und 284 nm; cLogP: 3.58 ± 0.52.

2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (14e)

Nach AAV 1, Methode A aus 208 mg (0.800 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 239 mg (0.960 mmol) *N*-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51e**). Reaktionsdauer: 24 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 106 mg (35%) beigefarbene Kristalle.

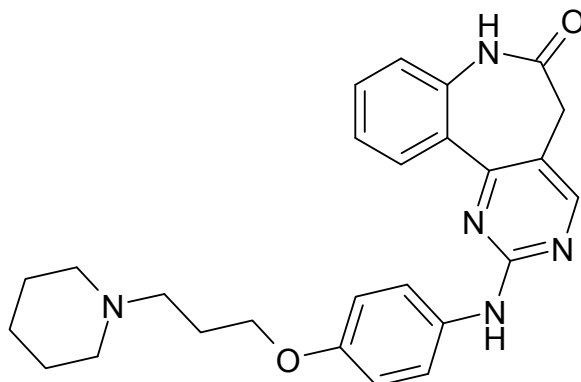
Schmp.: 275 °C; IR (KBr): 3185 cm⁻¹ (NH), ca. 2800-3200 (OH, breit), 3089 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2840 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.35 (CH₂ vom Wasserpeak überlagert), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 6.78 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.8, ArH), 6.96 (dd, 1H, *J* = 8.7/2.5 Hz, ArH), 7.50 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.6, ArH), 7.90 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.42 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.52 (s, 1H, NH), 9.68 (s (breit), 1H, OH), 10.16 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (-OCH₃); 36.4 (CH₂); 106.4, 110.6, 116.2, 119.0, 120.2, 131.3, 157.2 (tert. C); 116.4, 121.5, 133.3, 139.5, 147.5, 159.3, 160.5, 161.4, 171.3 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₁₉H₁₅ClN₄O₃ [382.80]; ber. C 59.62, H 3.95, N 14.64; gef. C 60.10, H 3.99, N 13.92; HRMS-EI (*m/z*): [M-H]⁺ ber. 381.07544, gef. 381.07470; HPLC: Reinheit: 98.4% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm; *t*_s: 3.84 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 35:65); λ_{max}: 247 und 282 nm; cLogP: 3.35 ± 0.53.

2-(3-Hydroxy-4-methoxyanilino)-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**14f**)



Nach AAV 1, Methode A aus 260 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 293 mg (1.20 mmol) *N*-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51f**). Reaktionsdauer: 30 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 63 mg (17%) farblose Kristalle.

Schmp.: 278 °C; IR (KBr): 3259 cm⁻¹ und 3207 cm⁻¹ (NH), ca. 2800-3300 (OH, breit), 3049 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2937 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH₂), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 6.76 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 6.83 (d, 1H, *J* = 9.0, ArH), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.6 Hz, ArH), 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.7/2.6 Hz, ArH), 7.30 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, Pyrimidin-H), 8.91 (s, 1H, OH), 9.40 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.4 (-OCH₃), 55.9 (-OCH₃); 36.3 (CH₂); 106.3, 107.5, 109.5, 110.5, 112.5, 131.4, 157.1 (tert. C); 115.8, 121.6, 134.3, 139.4, 142.5, 146.2, 159.4, 160.3, 161.3, 171.3 (quart. C); C₂₀H₁₈N₄O₄ [378.38]; ber. C 63.49, H 4.79, N 14.81; gef. C 63.06, H 4.75, N 14.09; HRMS-EI (*m/z*): ber. 378.13281, gef. 378.13268; HPLC: Reinheit: 95.7% bei 254 nm, 98.1% bei 280 nm; *t*_s: 4.11 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 30:70); λ_{max}: 285 nm; cLogP: 2.49 ± 0.54.

2-{4-[3-(1-Piperidinyl)propoxy]anilino}-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**16a**)

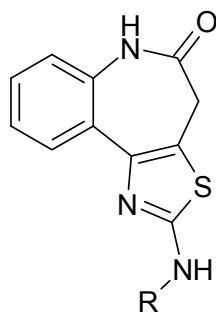
160 mg (0.500 mmol) 2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**10a**) werden mit 20 mg 60%iger Natriumhydrid*-Dispersion (entspricht 12 mg (0.50 mmol) Natriumhydrid) in 6 ml DMSO (trocken) für 30 min gerührt. Anschließend tropft man langsam eine Lösung von 150 mg (0.750 mmol) *N*-(Chlorpropyl)piperidin-Hydrochlorid und 140 mg (1.00 mmol) Kaliumcarbonat in 10 ml DMSO (trocken) zu. Es wird für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz in 100 ml Wasser gegossen und viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Dies dient zur Abtrennung des nicht vollständig umgesetzten Edukts **10a**, welches in Ethylacetat nur schwer löslich ist. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die organische Phase mit 1 g Kieselgel am Rotationsverdampfer eingengt. Es folgt eine säulenchromatographische Auftrennung. Zunächst wird mit reinem Ethylacetat eluiert. Dies dient wiederum der Abtrennung von nicht umgesetztem Edukt **10a**. Anschließend wird das Produktgemisch mit Dichlormethan:Methanol:Diethylamin 85:14:1 eluiert und in Fraktionen aufgefangen. Die das Produkt **16a** enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 28 mg (13%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 223 °C; IR (KBr): 3279 cm⁻¹ und 3203 cm⁻¹ (NH), 3059 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2930 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.41 (m, 2H, Piperidin-4'''-H), 1.54-1.55 (m, 4H, Piperidin-3'''/5'''-H), 1.89-1.91 (m, 2H, Propoxy-2''-H), 2.39-2.62 (m, 6H, Piperidin-2'''/6'''-H und Propoxy-3''-H, teilweise vom DMSO-Peak überlagert), 3.34 (s, 2H, CH₂, teilweise vom Wasserpeak überlagert), 3.96 (t, 2H, Propoxy-1''-H), 6.87-6.90 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H,

ArH), 7.23 (dd, 1H, $J = 8.2/1.0$ Hz, Ar-8-H), 7.34 (dt, 1H, $J = 8.2/1.3$ Hz, ArH), 7.56 (ddd, 1H, $J = 8.2/7.3/1.7$ Hz, ArH), 7.68-7.69 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.05 (dd, 1H, $J = 8.0/1.6$ Hz, Ar-11-H), 8.46 (s, 1H, Pyrimidin-H), 9.58 (s, 1H, NH), 10.26 (s, 1H, NH) (Zuordnung der Protonen erfolgte aufgrund von HSQC- und HMBC-Experimenten); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 24.0, 25.4 (2C), 26.2, 36.7, 54.2 (2C), 55.3, 66.3 (sek. C); 114.9 (2C), 120.9 (2C), 122.6, 124.5, 130.3, 131.7, 157.9 (tert. C); 117.4, 129.3, 134.2, 138.5, 153.9, 160.1, 161.0, 172.2 (quart. C); $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_2$ [362.39]; HRMS-EI (m/z): ber. 443.23215, gef. 443.23144; HPLC: Reinheit: 94.3% bei 254 nm, 94.6% bei 280 nm; t_s : 2.69 min, t_m (DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 25:75); λ_{max} : 232 und 278 nm; cLogP: 4.32 ± 0.48 .

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

Versuche zur Darstellung der Aminothiazol-Derivate 19



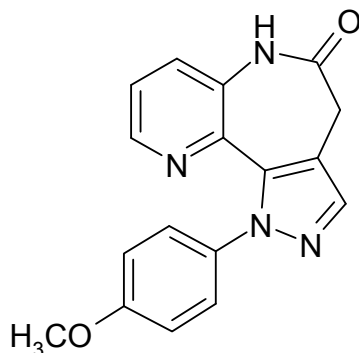
19a: R = Phenyl

19b: R = H

1 Äquivalent 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**32**) wurde mit einem leichten Überschuss an elementarem Iod (1.1 Äquivalente) und den in Tabelle 7-1 angegebenen Mengen eines Thioharnstoff-Derivats umgesetzt. Die Reaktionen wurden in getrocknetem Ethanol durchgeführt. Nach der angegebenen Zeit wurde mit 5%iger NaOH alkalisiert, um entstandene Aminothiazol-Hydroiodide zu deprotonieren. Anschließend wurde mit Dichlormethan (CH₂Cl₂) extrahiert. Die CH₂Cl₂-Phase wurde im Vakuum eingengt. Tabelle 7-1 stellt die Versuchsbedingungen und die jeweiligen Resultate dar.

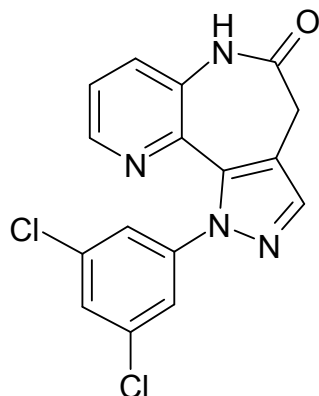
Tabelle 7-1: Angewandte Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Thiazol-Derivate **19**

| Methode | 32 [mmol] | Iod [mmol] | Thio- harnstoff [mmol] | T [°C] | Zeit [h] | Aufarbeitung / Resultate |
|---------|--------------|---------------|------------------------------|-----------|-------------|--|
| A | 1.00 | 1.10 | R = Phenyl- 3.00 | Reflux | 3 | Nach SC Öl, Produktgemisch. |
| B | 1.00 | 1.10 | R = H 3.00 | Reflux | 3 | Gelbe Kristalle; trotz Umkristallisation Gemisch. |
| C | 0.10 | 0.11 | R = H 0.30 | RT | 24 | Produktgemisch entsteht. |
| | | | | 45 | 1 | |
| | | | | 70 | 3 | |
| | | | | Reflux | 1 | |
| D | 0.10 | 0.11 | R = H 0.30 | RT | 100 | Edukt setzt sich nicht komplett um; Produktgemisch entsteht. |
| E | 0.10 | 0.11 | R = H 0.60 | RT | 100 | Edukt setzt sich nicht komplett um, Produktgemisch entsteht. |
| F | 0.50 | 0.550 | R = H 0.50 | Reflux | 2.5 | Neutralisation mit NaHCO ₃ , Extraktion mit Ethylacetat:→ Nach Einengen im Vakuum Isolierung eines Fest- stoffs; ¹ H-NMR nicht auswertbar. |
| G | 1.00 | 1.10 | R = H 1.0 | Reflux | 2 | Erneute Isolierung des Feststoffs gelingt nicht. |

1-(4-Methoxyphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrido[3,2-*b*]azepin-5(1*H*)-on (20a)

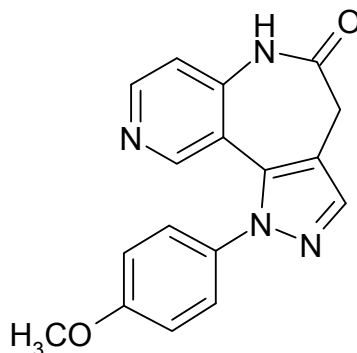
Nach AAV 2 aus 140 mg (0.600 mmol) 8-(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 157 mg (0.900 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 127 mg (69%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 292 °C; IR (KBr): 3207 cm⁻¹ (NH), 3118 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2977 cm⁻¹ und 2919 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1667 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.41 (s, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 6.91-6.94 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.17-7.19 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8.2/4.6 Hz, ArH), 7.63 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.5 Hz, ArH), 7.74 (s, 1H, ArH), 8.19 (dd, 1H, *J* = 4.5/1.4 Hz, ArH), 10.22 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.2 (-OCH₃); 31.9 (CH₂); 113.5 (2C), 123.3, 125.7 (2C), 130.1, 137.5, 144.2 (tert. C); 118.6, 132.8, 133.6, 135.5, 138.6, 158.0, 172.3 (quart. C); C₁₇H₁₄N₄O₂ [306.33]; ber. C 66.66, H 4.61, N 18.29; gef. C 65.91, H 4.62, N 18.06; HRMS-EI (*m/z*): ber. 306.11166, gef. 306.11127; HPLC: Reinheit: 99.5% bei 254 nm, 99.3% bei 280 nm; *t*_s: 6.74 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 20:80); λ_{max}: 258 nm; cLogP: 2.22 ± 0.89.

1-(3,5-Dichlorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrido[3,2-*b*]azepin-5(1*H*)-on (20b)

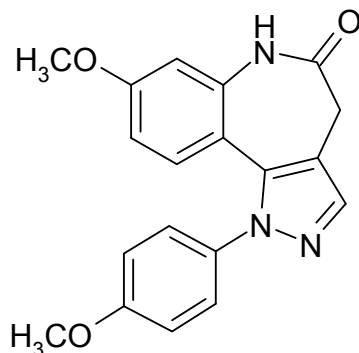
Nach AAV 2 aus 140 mg (0.600 mmol) 8-(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 192 mg (0.900 mmol) 3,5-Dichlorphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 18 mg (9%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 302 °C; IR (KBr): 3211 cm⁻¹ (NH), 3125 cm⁻¹ (CH aromatisch), 3079 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1665 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH₂), 7.38 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.1/4.6 Hz, ArH), 7.63 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.68 (dd, 1H, *J* = 8.4/1.4 Hz, ArH), 7.87 (s, 1H, ArH), 8.25 (dd, 1H, *J* = 4.5/1.5 Hz, ArH), 10.30 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH₂); 123.1 (2C), 123.9, 126.6, 130.4, 139.3, 144.1 (tert. C); 119.8, 133.2, 133.6 (2C), 136.1, 137.9, 142.1, 171.9 (quart. C); C₁₆H₁₀Cl₂N₄O [345.19]; ber. C 55.67, H 2.92, N 16.23; gef. C 55.48, H 3.01, N 15.34; HRMS-EI (*m/z*): [M-H]⁺ ber. 343.01534, gef. 343.01440; HPLC: Reinheit: 98.1% bei 254 nm, 98.2% bei 280 nm; *t*_s: 3.98 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 45:55); λ_{max}: 261 nm; cLogP: 3.51 ± 0.58.

1-(4-Methoxyphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrido[4,3-*b*]azepin-5(1*H*)-on (21a)

Nach AAV 2 aus 146 mg (0.630 mmol) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) und 165 mg (0.950 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 24 mg (12%) hellbraune Kristalle.

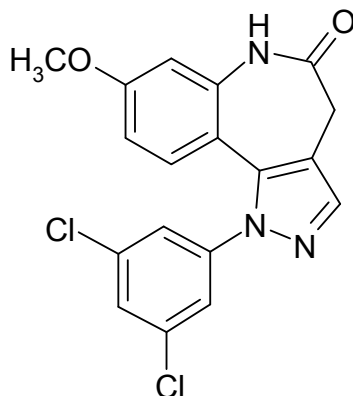
Schmp.: 273 °C; IR (KBr): 3209 cm⁻¹ (NH), 3107 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 7.01-7.04 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.20 (d, 1H, *J* = 5.5, ArH), 7.25-7.28 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.97 (s, 1H, ArH), 8.36 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, ArH), 10.53 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.4 (-OCH₃); 32.1 (CH₂); 114.5 (2C), 116.2, 126.6 (2C), 137.9, 148.7, 148.9 (tert. C); 115.2, 117.3, 132.6, 133.7, 142.3, 158.8, 172.2 (quart. C); C₁₇H₁₄N₄O₂ [306.33]; ber. C 66.66, H 4.61, N 18.29; gef. C 66.63, H 4.54, N 17.83; HRMS-EI (*m/z*): ber. 306.11166, gef. 306.11094; HPLC: Reinheit: 99.1% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm; *t*_s: 3.34 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 25:75); λ_{max}: 231 und 271 nm; cLogP: 2.55 ± 0.90.

8-Methoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-on
(22a)

Nach AAV 2 aus 208 mg (0.800 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 210 mg (1.20 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 1.5 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 164 mg (61%) farblose Kristalle.

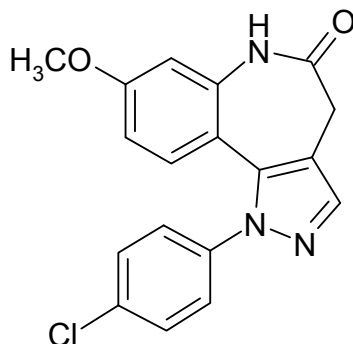
Schmp.: 253 °C; IR (KBr): 3196 cm⁻¹ (NH), 3086 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.29 (s, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 6.63 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.6 Hz, ArH), 6.75 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, ArH), 6.83 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 6.98-7.02 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.20-7.24 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.67 (s, 1H, ArH), 9.99 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.2 (-OCH₃), 55.4 (-OCH₃); 32.0 (CH₂); 107.4, 110.0, 114.3 (2C), 126.3 (2C), 129.3, 137.4 (tert. C); 112.7, 115.9, 132.9, 136.1, 137.5, 158.5, 159.3, 172.4 (quart. C); C₁₉H₁₇N₃O₃ [335.37]; ber. C 68.05, H 5.11, N 12.53; gef. C 67.89, H 5.10, N 12.22; HPLC: Reinheit: 98.6% bei 254 nm, 98.6% bei 280 nm; t_s: 5.13 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 35:65); λ_{max}: 232 und 271 nm; cLogP: 3.22 ± 0.90.

1-(3,5-Dichlorphenyl)-8-methoxy-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(22b)



Nach AAV 2 aus 208 mg (0.800 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 256 mg (1.20 mmol) 3,5-Dichlorphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 2 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 191 mg (64%) farblose Kristalle.

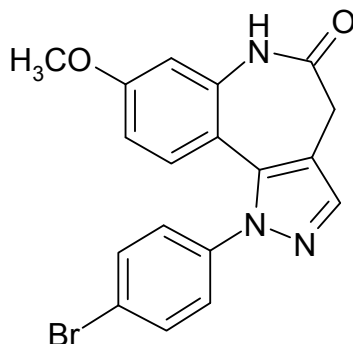
Schmp.: 243 °C; IR (KBr): 3214 cm⁻¹ (NH), 3075 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1686 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.6 Hz, ArH), 6.87-6.88 (m, 2H, ArH), 7.38 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.69 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.81 (s, 1H, ArH), 10.08 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.2 (-OCH₃); 31.8 (CH₂); 107.3, 110.2, 123.1 (2C), 127.1, 129.6, 139.2 (tert. C); 111.8, 117.3, 134.2 (2C), 136.5, 137.5, 141.4, 159.6, 172.1 (quart. C); C₁₈H₁₃Cl₂N₃O₂ [374.23]; ber. C 57.77, H 3.50, N 11.23; gef. C 57.59, H 3.43, N 10.94; HPLC: Reinheit: 99.5% bei 254 nm, 99.5% bei 280 nm; t_s: 5.21 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 50:50); λ_{max}: 229 und 273 nm; cLogP: 4.50 ± 0.59.

1-(4-Chlorphenyl)-8-methoxy-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(22c)

Nach AAV 2 aus 217 mg (0.830 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 224 mg (1.25 mmol) 4-Chlorphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 207 mg (73%) farblose Kristalle.

Schmp.: 259 °C; IR (KBr): 3200 cm⁻¹ (NH), 3093 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2961 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.31 (s, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 6.67 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.5 Hz, ArH), 6.78 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.31-7.35 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.51-7.54 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArH), 10.04 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.0 (-OCH₃); 31.7 (CH₂); 107.5, 110.2, 126.3 (2C), 129.3 (2C), 129.5, 138.6 (tert. C); 112.4, 116.9, 124.6, 132.0, 136.3, 137.5, 159.5, 172.4 (quart. C); C₁₈H₁₄ClN₃O₂ [339.78]; ber. C 63.63, H 4.15, N 12.37; gef. C 63.55, H 4.07, N 11.98; HPLC: Reinheit: 99.6% bei 254 nm, 99.4% bei 280 nm; *t*_s: 6.55 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 40:60); λ_{max}: 225 und 270 nm; cLogP: 3.89 ± 0.57.

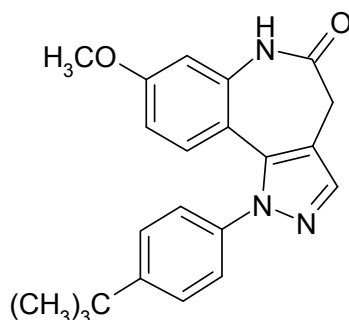
1-(4-Bromphenyl)-8-methoxy-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(22d)



Nach AAV 2 aus 208 mg (0.800 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 268 mg (1.20 mmol) 4-Bromphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 2 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 181 mg (59%) farblose Kristalle.

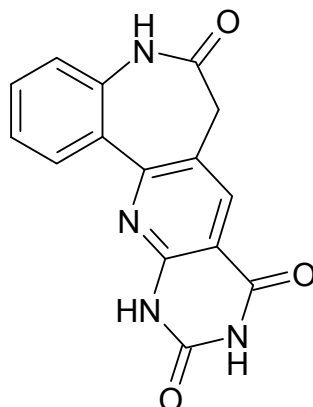
Schmp.: 269 °C; IR (KBr): 3196 cm⁻¹ (NH), 3091 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2981 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1690 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.31 (s, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 6.68 (dd, 1H, *J* = 8.9/2.6 Hz, ArH), 6.79 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 6.84 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 7.26-7.28 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.65-7.67 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 10.08 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.2 (-OCH₃); 31.8 (CH₂); 107.4, 110.1, 126.4 (2C), 129.5, 132.1 (2C), 138.5 (tert. C); 112.2, 116.8, 120.3, 136.1, 137.3, 138.8, 159.4, 172.3 (quart. C); C₁₈H₁₄BrN₃O₂ [384.24]; ber. C 56.27, H 3.67, N 10.94; gef. C 56.20, H 3.67, N 10.72; HPLC: Reinheit: 99.5% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm; *t*_s: 2.95 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 50:50); λ_{max}: 228 und 269 nm; cLogP: 4.07 ± 0.59.

1-(4-*tert*-Butylphenyl)-8-methoxy-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(22e)



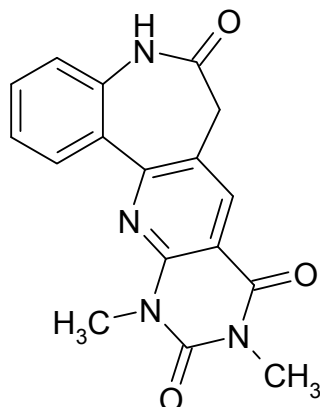
Nach AAV 2 aus 200 mg (0.770 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 231 mg (1.15 mmol) 4-*tert*-Butylphenylhydrazinhydrochlorid. Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 157 mg (56%) farblose Kristalle.

Schmp.: 273 °C; IR (KBr): 3182 cm⁻¹ (NH), 3094 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2965 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1690 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.30 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 3.29 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 6.62 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.5 Hz, ArH), 6.77 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, ArH), 6.83 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 7.21-7.24 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.46-7.48 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 10.04 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.0 (-C(CH₃)₃, 3C); 55.2 (-OCH₃); 31.9 (CH₂); 107.3, 110.1, 124.2 (2C), 125.9 (2C), 129.4, 137.3 (tert. C); 34.3, 112.7, 116.3, 135.9, 137.8, 150.1, 159.2, 172.4 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 512 Scans); C₂₂H₂₃N₃O₂ [361.45]; ber. C 73.11, H 6.41, N 11.63; gef. C 72.62, H 6.38, N 11.31; HPLC: Reinheit: 99.2% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm; t_s: 6.10 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 50:50); λ_{max}: 224 und 270 nm; cLogP: 4.99 ± 0.56.

7,12-Dihydro-5H-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6,9,11(10H)-trion (**24a**)

Nach AAV 3 aus 230 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) und 127 mg (1.00 mmol) 6-Aminouracil (**72**). Reaktionsdauer: 4 h. Umkristallisation aus DMF ergibt 160 mg (54%) hellgelbes Pulver.

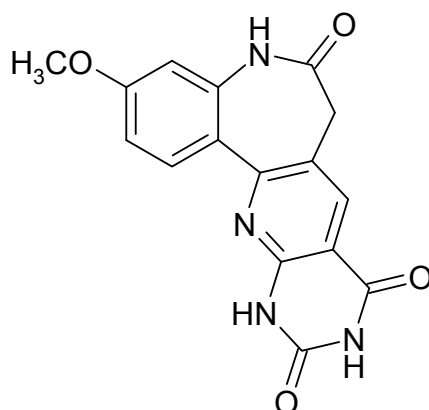
Schmp.: > 395 °C; IR (KBr): 3442 cm⁻¹ und 3180 cm⁻¹ (NH), 3001 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2830 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1734 cm⁻¹ und 1672 cm⁻¹ (breit) (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.54 (s, 2H, CH₂), 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, ArH), 7.30-7.35 (m, 1H, ArH), 7.55 (dt, 1H, *J* = 7.9/1.6 Hz, ArH), 7.98 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.31 (s, 1H, Pyridin-H), 10.27 (s, 1H, NH, Signal verschwindet nach D₂O-Zugabe), 11.47 (s, 1H, NH, Signal verschwindet nach D₂O-Zugabe), 11.73 (s, 1H, NH, Signal verschwindet nach D₂O-Zugabe); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.3 (CH₂); 121.3, 123.1, 130.2, 130.3, 135.8 (tert. C); 108.7, 124.0, 128.6, 137.2, 149.8, 150.6, 157.1, 161.5, 170.5 (quart. C); C₁₅H₁₀N₄O₃ [294.27]; ber. C 61.22, H 3.43, N 19.04; gef. C 60.43, H 3.56, N 18.52; HRMS-El (m/z): ber. 294.07529, gef. 294.07483; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; t_s: 1.99 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 15:85); λ_{max}: 334 nm; cLogP: 0.22 ± 0.37.

10,12-Dimethyl-7,12-dihydro-5H-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6,9,11-(10H)-trion (**24b**)

Nach AAV 3 aus 115 mg (0.500 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**46**) und 78 mg (0.50 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2,4-dion. Reaktionsdauer: 4 h. Zur Reinigung wird aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 80 mg (50%) hellgelbes Pulver.

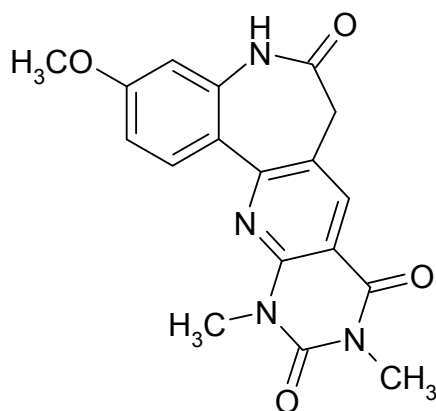
Schmp.: > 385 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3188 cm⁻¹ (NH), 3069 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹ und 2919 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1717 cm⁻¹, 1702 cm⁻¹ und 1662 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, 3H, -NCH₃), 3.65 (s, 3H, -NCH₃), 3.60 (s, 2H, CH₂), 7.24 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.36 (dt, 1H, *J* = 8.4/1.1 Hz, ArH), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.0/7.3/1.6 Hz, ArH), 8.11 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 8.44 (s, 1H, Pyridin-H), 10.34 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.5 (-NCH₃), 29.6 (-NCH₃); 39.1 (CH₂); 122.3, 124.4, 131.2, 131.4, 137.4 (tert. C); 110.1, 125.0, 129.6, 138.3, 149.8, 151.4, 157.4, 161.1, 171.5 (quart. C); C₁₇H₁₄N₄O₃ [322.33]; ber. C 63.35, H 4.38, N 17.38; gef. C 62.62, H 4.38, N 16.78; HRMS-EI (m/z): ber. 322.10657, gef. 322.10643; HPLC: Reinheit: 99.7% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm; t_s: 3.96 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 25:75); λ_{max}: 275 und 336 nm; cLogP: 0.93 ± 0.78.

3-Methoxy-7,12-dihydro-5H-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6,9,11-(10H)-trion (**25a**)



Nach AAV 3 aus 260 mg (1.00 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 127 mg (1.00 mmol) 6-Aminouracil (**72**). Reaktionsdauer: 6 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 124 mg (38%) gelbes Pulver.

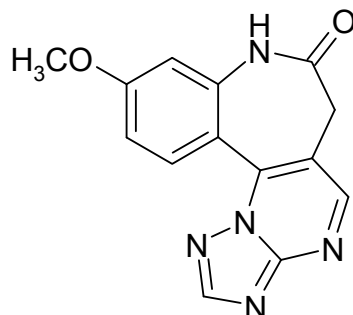
Schmp.: > 380 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3434 cm⁻¹ und 3200 cm⁻¹ (NH), 3064 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1729 cm⁻¹, 1701 cm⁻¹ und 1684 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 3.53 (s, 2H, CH₂), 6.76 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.5 Hz, ArH), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.26 (s, 1H, Pyridin-H), 10.22 (s, 1H, NH), 11.45 (s, 1H, NH), 11.70 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 56.3 (-OCH₃); 40.0 (CH₂); 107.0, 111.6, 133.2, 137.3, (tert. C); 109.6, 123.0, 124.6, 140.2, 151.4, 152.2, 158.7, 162.1, 163.1, 171.8 (quart. C); C₁₆H₁₂N₄O₄ [324.30]; ber. C 59.26, H 3.73, N 17.28; gef. C 57.33, H 3.89, N 16.56; HRMS-EI (*m/z*): ber. 324.08588, gef. 324.08525; HPLC: Reinheit: 98.9% bei 254 nm, 95.1% bei 280 nm; *t*_s: 2.60 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 15:85); λ_{max}: 290 und 346 nm; cLogP: 0.38 ± 0.41.

3-Methoxy-10,12-dimethyl-7,12-dihydro-5H-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-d][1]benzazepin-6,9,11(10H)-trion (**25b**)

Nach AAV 3 aus 156 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 93 mg (0.60 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2,4-dion. Reaktionsdauer: 5 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 125 mg (59%) beiges Pulver.

Schmp.: > 390; IR (KBr): 3196 cm^{-1} (NH), 3097 cm^{-1} und 3066 cm^{-1} (CH aromatisch), 2953 cm^{-1} und 2926 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1718 cm^{-1} , 1703 cm^{-1} und 1668 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, 3H, -NCH₃), 3.64 (s, 3H, -NCH₃), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 3.40 (Azepin-CH₂ vom Wasserpeak überlagert), 6.77 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 6.97 (dd, 1H, J = 8.8/2.8 Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, J = 8.8 Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, Pyridin-H), 10.27 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ([D₆]DMSO, 150.9 MHz): Signale bei 2000 Scans nicht detektierbar aufgrund schlechter Löslichkeit; C₁₈H₁₆N₄O₄ [352.34]; ber. C 61.36, H 4.58, N 15.90; gef. C 60.99, H 4.60, N 15.45; HRMS-EI (m/z): ber. 352.11713, gef. 352.11625; HPLC: Reinheit: 99.2% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm; t_s : 6.10 min, t_m (DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 30:70); λ_{max} : 349 nm; cLogP: 1.10 \pm 0.80.

10-Methoxy-6,8-dihydro-7*H*-[1,2,4]triazolo[5',1':2,3]pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-7-on
(25c)



Nach AAV 4 bei 140 °C aus 234 mg (0.900 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 78 mg (0.92 mmol) 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**91**). Reaktionsdauer: 20 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 125 mg (44%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 296 °C; IR (KBr): 3206 cm⁻¹ (NH), 3105 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2959 cm⁻¹ und 2925 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1682 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.37 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 3.79 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 6.89 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.03 (dd, 1H, *J* = 9.3/2.6 Hz, ArH), 8.42 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 8.94 (s, 1H, ArH), 10.42 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.6 (-OCH₃); 35.9 (CH₂); 106.6, 110.0, 132.7, 154.6, 155.2 (tert. C); 112.4, 116.3, 140.6, 141.6, 155.0, 162.0, 171.3 (quart. C); C₁₄H₁₁N₅O₂ [281.27]; ber. C 59.78, H 3.94, N 24.90; gef. C 59.78, H 3.91, N 23.38; HRMS-EI (*m/z*): ber. 281.09128, gef. 281.09092; HPLC: Reinheit: 97.0% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm; *t*_s: 2.64 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 15:85); λ_{max}: 335 nm; cLogP: 0.50 ± 0.86.

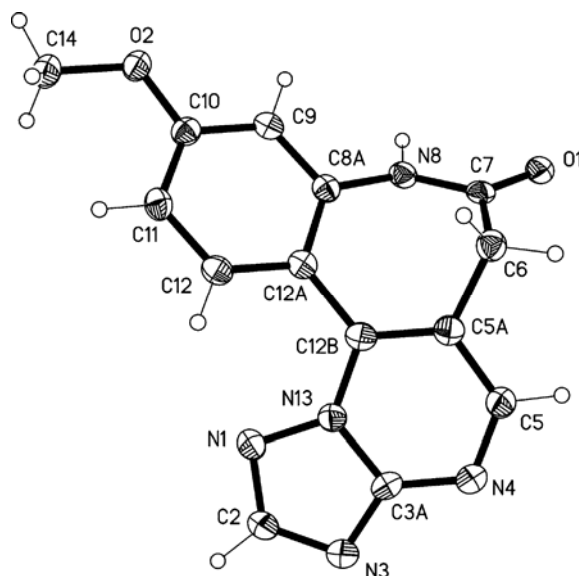


Abbildung 7-1: Röntgenkristallstruktur von **25c**^a

^aDie kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Kristalldaten und Strukturverfeinerung:

| | |
|------------------------------|--|
| Summenformel: | C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₂ |
| Mr: | 281.28 |
| Temperatur: | 103(2) K |
| Wellenlänge: | 1.54184 Å |
| Kristallsystem: | Monoclinic |
| Raumgruppe: | P2 ₁ /n |
| Gitterkonstanten: | $a = 4.2924(3) \text{ Å} \quad \alpha = 90^\circ$ $b = 20.3211(10) \text{ Å} \quad \beta = 97.456(7)^\circ$ $c = 14.0824(8) \text{ Å} \quad \gamma = 90^\circ$ |
| Volumen: | 1217.97(13) Å ³ |
| Z: | 4 |
| Dichte (berechnet): | 1.534 Mg/m ³ |
| Absorptionskoeffizient: | 0.899 mm ⁻¹ |
| F(000): | 584 |
| Kristallgröße: | 0.20 x 0.05 x 0.03 mm ³ |
| θ-Bereich für Datensammlung: | 3.84 bis 71.31° |

| | |
|--|--|
| Limitierende Indices: | $-4 \leq h \leq 4, -24 \leq k \leq 24, -17 \leq l \leq 16$ |
| Zahl der Reflexe: | 16932 |
| Unabhängige Reflexe: | 2256 [$R(\text{int}) = 0.0368$] |
| Vollständigkeit bis $\theta = 67.50^\circ$: | 98.1% |
| Absorptionskorrektur: | Semi-empirical from equivalents |
| Max. und Min. Transmission: | 1.00000 und 0.83851 |
| Verfeinerungsmethode: | Full-matrix least-squares on F^2 |
| Daten/Einschränkungen/Parameter: | 2256 / 0 / 195 |
| Goodness-of-fit on F^2 : | 1.050 |
| Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]: | $R_1 = 0.0359, wR_2 = 0.0918$ |
| R indices (alle Daten): | $R_1 = 0.0433, wR_2 = 0.0972$ |
| Größte Differenzpeaks: | 0.177 und -0.224 e.Å ⁻³ |

Tabelle 7-2: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.^{a,b}

| | x | y | z | U(eq) |
|--------|----------|-----------|------------|---------|
| N(1) | 4030(3) | 1970.2(6) | 6933.2(9) | 26.7(3) |
| C(2) | 2678(4) | 1379.0(7) | 6847.6(11) | 30.3(4) |
| N(3) | 1033(4) | 1228.2(6) | 5996.1(9) | 32.6(3) |
| C(3A) | 1372(4) | 1768.1(7) | 5479.7(10) | 26.1(3) |
| N(4) | 170(4) | 1882.4(6) | 4569.4(9) | 29.8(3) |
| C(5) | 929(4) | 2452.6(7) | 4221.2(11) | 25.9(3) |
| C(5A) | 2814(4) | 2933.1(7) | 4738.7(10) | 22.2(3) |
| C(6) | 3612(4) | 3554.1(7) | 4243.1(10) | 23.7(3) |
| C(7) | 1830(3) | 4124.8(7) | 4592.0(10) | 21.1(3) |
| N(8) | 2441(3) | 4269.0(6) | 5533.5(8) | 21.0(3) |
| C(8A) | 4830(3) | 4010.0(7) | 6221.5(10) | 19.5(3) |
| C(9) | 6238(4) | 4462.4(7) | 6878.5(10) | 21.6(3) |
| C(10) | 8523(4) | 4272.5(7) | 7617.6(10) | 21.8(3) |
| C(11) | 9440(4) | 3611.4(7) | 7701.3(10) | 22.5(3) |
| C(12) | 7973(4) | 3159.7(7) | 7060.7(10) | 21.8(3) |
| C(12A) | 5630(3) | 3333.5(7) | 6313.5(10) | 20.2(3) |
| C(12B) | 3931(3) | 2835.5(7) | 5691.5(10) | 21.0(3) |
| N(13) | 3221(3) | 2224.1(6) | 6035.5(8) | 22.5(3) |
| C(14) | 11875(4) | 4582.8(8) | 9035.3(11) | 28.7(4) |
| O(1) | -152(3) | 4434.8(5) | 4055.8(7) | 25.3(3) |
| O(2) | 9716(3) | 4761.7(5) | 8205.4(7) | 26.8(3) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-3: Bindungslängen [\AA]^{a,b}

| | | | |
|--------------|------------|---------------|------------|
| N(1)-C(2) | 1.333(2) | C(7)-N(8) | 1.3499(18) |
| N(1)-N(13) | 1.3679(17) | N(8)-C(8A) | 1.4175(18) |
| C(2)-N(3) | 1.346(2) | C(8A)-C(9) | 1.386(2) |
| N(3)-C(3A) | 1.334(2) | C(8A)-C(12A) | 1.419(2) |
| C(3A)-N(4) | 1.339(2) | C(9)-C(10) | 1.389(2) |
| C(3A)-N(13) | 1.3931(19) | C(10)-O(2) | 1.3512(17) |
| N(4)-C(5) | 1.315(2) | C(10)-C(11) | 1.401(2) |
| C(5)-C(5A) | 1.409(2) | C(11)-C(12) | 1.380(2) |
| C(5A)-C(12B) | 1.379(2) | C(12)-C(12A) | 1.403(2) |
| C(5A)-C(6) | 1.503(2) | C(12A)-C(12B) | 1.469(2) |
| C(6)-C(7) | 1.506(2) | C(12B)-N(13) | 1.3818(19) |
| C(7)-O(1) | 1.2345(18) | C(14)-O(2) | 1.4407(18) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-4: Bindungswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

| | | | |
|-------------------|------------|---------------------|------------|
| C(2)-N(1)-N(13) | 101.59(12) | N(8)-C(8A)-C(12A) | 124.56(12) |
| N(1)-C(2)-N(3) | 117.26(13) | C(8A)-C(9)-C(10) | 121.36(13) |
| C(3A)-N(3)-C(2) | 102.52(13) | O(2)-C(10)-C(9) | 115.43(13) |
| N(3)-C(3A)-N(4) | 127.51(14) | O(2)-C(10)-C(11) | 125.04(13) |
| N(3)-C(3A)-N(13) | 109.58(13) | C(9)-C(10)-C(11) | 119.53(13) |
| N(4)-C(3A)-N(13) | 122.91(13) | C(12)-C(11)-C(10) | 118.92(13) |
| C(5)-N(4)-C(3A) | 115.25(13) | C(11)-C(12)-C(12A) | 122.98(13) |
| N(4)-C(5)-C(5A) | 124.81(14) | C(12)-C(12A)-C(8A) | 116.99(13) |
| C(12B)-C(5A)-C(5) | 120.47(13) | C(12)-C(12A)-C(12B) | 121.72(13) |
| C(12B)-C(5A)-C(6) | 120.08(13) | C(8A)-C(12A)-C(12B) | 121.17(13) |
| C(5)-C(5A)-C(6) | 119.45(13) | C(5A)-C(12B)-N(13) | 113.94(13) |
| C(5A)-C(6)-C(7) | 109.82(12) | C(5A)-C(12B)-C(12A) | 124.33(13) |
| O(1)-C(7)-N(8) | 121.38(14) | N(13)-C(12B)-C(12A) | 121.69(12) |
| O(1)-C(7)-C(6) | 122.14(13) | N(1)-N(13)-C(12B) | 128.48(12) |
| N(8)-C(7)-C(6) | 116.45(12) | N(1)-N(13)-C(3A) | 109.03(12) |
| C(7)-N(8)-C(8A) | 128.45(13) | C(12B)-N(13)-C(3A) | 122.45(12) |
| C(9)-C(8A)-N(8) | 115.10(12) | C(10)-O(2)-C(14) | 117.65(11) |
| C(9)-C(8A)-C(12A) | 120.14(13) | | |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogene Standardabweichung.

Tabelle 7-5: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

| | | | |
|--------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| N(13)-N(1)-C(2)-N(3) | -1.2(2) | C(11)-C(12)-C(12A)-C(12B) | -174.92(14) |
| N(1)-C(2)-N(3)-C(3A) | 0.6(2) | C(9)-C(8A)-C(12A)-C(12) | -2.9(2) |
| C(2)-N(3)-C(3A)-N(4) | -179.48(17) | N(8)-C(8A)-C(12A)-C(12) | -177.46(13) |
| C(2)-N(3)-C(3A)-N(13) | 0.30(19) | C(9)-C(8A)-C(12A)-C(12B) | 173.28(13) |
| N(3)-C(3A)-N(4)-C(5) | -178.45(17) | N(8)-C(8A)-C(12A)-C(12B) | -1.3(2) |
| N(13)-C(3A)-N(4)-C(5) | 1.8(2) | C(5)-C(5A)-C(12B)-N(13) | 4.5(2) |
| C(3A)-N(4)-C(5)-C(5A) | -1.1(2) | C(6)-C(5A)-C(12B)-N(13) | -175.32(13) |
| N(4)-C(5)-C(5A)-C(12B) | -2.3(2) | C(5)-C(5A)-C(12B)-C(12A) | -173.41(14) |
| N(4)-C(5)-C(5A)-C(6) | 177.56(15) | C(6)-C(5A)-C(12B)-C(12A) | 6.8(2) |
| C(12B)-C(5A)-C(6)-C(7) | -72.15(18) | C(12)-C(12A)-C(12B)-C(5A) | -147.72(15) |
| C(5)-C(5A)-C(6)-C(7) | 108.02(15) | C(8A)-C(12A)-C(12B)-C(5A) | 36.3(2) |
| C(5A)-C(6)-C(7)-O(1) | -116.21(15) | C(12)-C(12A)-C(12B)-N(13) | 34.5(2) |
| C(5A)-C(6)-C(7)-N(8) | 61.81(16) | C(8A)-C(12A)-C(12B)-N(13) | -141.46(15) |
| O(1)-C(7)-N(8)-C(8A) | -173.06(13) | C(2)-N(1)-N(13)-C(12B) | 179.09(15) |
| C(6)-C(7)-N(8)-C(8A) | 8.9(2) | C(2)-N(1)-N(13)-C(3A) | 1.27(17) |
| C(7)-N(8)-C(8A)-C(9) | 140.61(15) | C(5A)-C(12B)-N(13)-N(1) | 178.56(14) |
| C(7)-N(8)-C(8A)-C(12A) | -44.6(2) | C(12A)-C(12B)-N(13)-N(1) | -3.5(2) |
| N(8)-C(8A)-C(9)-C(10) | 177.27(13) | C(5A)-C(12B)-N(13)-C(3A) | -3.9(2) |
| C(12A)-C(8A)-C(9)-C(10) | 2.2(2) | C(12A)-C(12B)-N(13)-C(3A) | 174.10(14) |
| C(8A)-C(9)-C(10)-O(2) | 179.72(13) | N(3)-C(3A)-N(13)-N(1) | -1.04(18) |
| C(8A)-C(9)-C(10)-C(11) | 0.3(2) | N(4)-C(3A)-N(13)-N(1) | 178.75(15) |
| O(2)-C(10)-C(11)-C(12) | 178.68(14) | N(3)-C(3A)-N(13)-C(12B) | -179.02(14) |
| C(9)-C(10)-C(11)-C(12) | 1.9(2) | N(4)-C(3A)-N(13)-C(12B) | 0.8(2) |
| C(10)-C(11)-C(12)-C(12A) | 1.2(2) | C(9)-C(10)-O(2)-C(14) | 174.29(13) |
| C(11)-C(12)-C(12A)-C(8A) | 1.2(2) | C(11)-C(10)-O(2)-C(14) | -6.3(2) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-6: Wasserstoffbrückenbindungen [\AA und $^\circ$]^{a,b}

| D-H...A | d(D-H) | d(H...A) | d(D...A) | $\angle(\text{DHA})$ |
|-----------------------|---------|----------|------------|----------------------|
| N(8)-H(8)...O(1)#1 | 0.87(2) | 2.03(2) | 2.8958(16) | 172.5(19) |
| C(5)-H(5)...N(1)#2 | 0.95 | 2.50 | 3.4264(19) | 165.8 |
| C(14)-H(14B)...N(3)#3 | 0.98 | 2.69 | 3.464(2) | 136.5 |
| C(11)-H(11)...N(4)#4 | 0.95 | 2.56 | 3.5069(19) | 177.1 |
| C(2)-H(2)...O(1)#5 | 0.95 | 2.63 | 3.5385(18) | 159.2 |
| C(6)-H(6B)...O(1)#6 | 0.99 | 2.43 | 3.2591(19) | 141.2 |

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 $-x, -y+1, -z+1$

#2 $x-1/2, -y+1/2, z-1/2$

#3 $-x+3/2, y+1/2, -z+3/2$

#4 $x+3/2, -y+1/2, z+1/2$

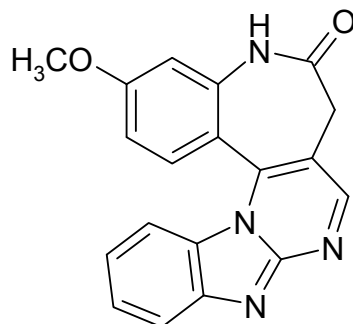
#5 $x+1/2, -y+1/2, z+1/2$

#6 $x+1, y, z$

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

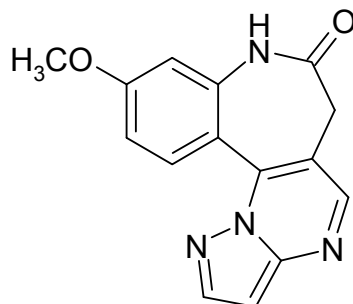
3-Methoxy-5,7-dihydro-6*H*-benzimidazo[2',1':2,3]pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on
(25d)



Nach AAV 4 bei 140 °C aus 234 mg (0.900 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 122 mg (0.920 mmol) 2-Aminobenzimidazol (**92**). Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 55 mg (18%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 237 °C; IR (KBr): 3199 cm⁻¹ (NH), 3119 cm⁻¹ und 3048 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2965 cm⁻¹ und 2840 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1688 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.27 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, CH₂), 3.69 (dd, 1H, *J* = 14.1/1.7 Hz, CH₂, Signal wird nach D₂O-Zugabe zu d), 3.92 (s, 3H, -OCH₃), 6.97 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.7 Hz, ArH), 7.19 (ddd, 1H, *J* = 8.3/7.1/1.3 Hz, ArH), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.3/7.1/1.2 Hz, ArH), 7.87-7.89 (m, 2H, ArH), 8.85 (s, 1H, Pyrimidin-H), 10.44 (s, 1H, NH, Signal wird nach D₂O-Zugabe gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.6 (-OCH₃); 35.7 (CH₂); 107.2, 110.3, 114.9, 119.7, 120.6, 125.6, 130.8, 155.2 (tert. C); 113.7, 115.6, 126.9, 140.2, 142.4, 144.3, 151.4, 162.0, 172.4 (quart. C); C₁₉H₁₄N₄O₂ [330.34]; ber. C 69.08, H 4.27, N 16.96; gef. C 68.32, H 4.73, N 16.17; HRMS-EI (*m/z*): ber. 330.11166, gef. 330.11184; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm; *t*_s: 6.64 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 25:75); λ_{max}: 257, 325 und 397 nm; cLogP: 2.65 ± 1.31.

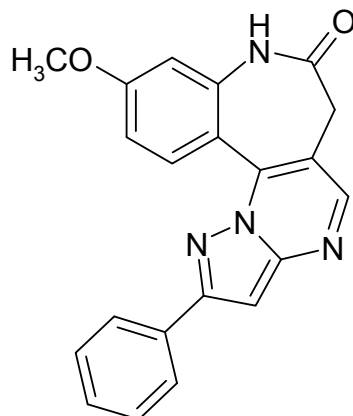
10-Methoxy-6,8-dihydro-7*H*-pyrazolo[5',1':2,3]pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-7-on
(25e)



Nach AAV 4 bei 120 °C aus 234 mg (0.900 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 76 mg (0.92 mmol) 3-Aminopyrazol (**93**). Reaktionsdauer: 10 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 175 mg (69%) gelbe Kristalle.

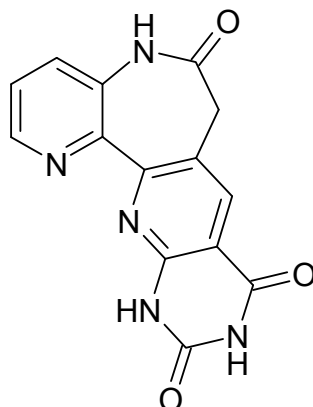
Schmp.: 343 °C; IR (KBr): 3200 cm⁻¹ (NH), 3105 cm⁻¹ und 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2936 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1681 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.29 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz, CH₂), 3.67 (dd, 1H, *J* = 13.8/2.0 Hz, CH₂), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 6.84 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 6.87 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, ArH), 7.00 (dd, 1H, *J* = 9.0/2.7 Hz, ArH), 8.24 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 8.46 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, ArH), 8.62 (s, 1H, Pyrimidin-H), 10.38 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.4 (-OCH₃); 35.8 (CH₂); 96.7, 106.5, 109.7, 132.5, 144.0, 149.4 (tert. C); 113.1, 114.2, 139.5, 140.2, 148.5, 161.4, 171.8 (quart. C); C₁₅H₁₂N₄O₂ [280.28]; ber. C 64.28, H 4.32, N 19.99; gef. C 64.17, H 4.34, N 19.45; HRMS-EI (*m/z*): ber. 280.09604, gef. 280.09580; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 99.7% bei 280 nm; *t*_s: 3.21 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 25:75); λ_{max}: 230, 284 und 356 nm; cLogP: 1.50 ± 0.83.

10-Methoxy-2-phenyl-6,8-dihydro-7H-pyrazolo[5',1':2,3]pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-7-on (**25f**)



Nach AAV 4 bei 120 °C aus 234 mg (0.900 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**49**) und 146 mg (0.920 mmol) 3-Phenyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**94**). Reaktionsdauer: 10 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 254 mg (79%) gelbe Kristalle.

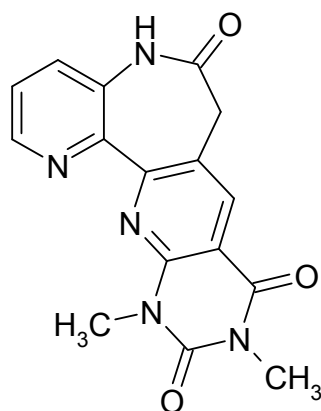
Schmp.: 324 °C; IR (KBr): 3198 cm⁻¹ (NH), 3121 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1683 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.30 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, CH₂), 3.67 (dd, 1H, *J* = 14.0/1.9 Hz, CH₂), 3.90 (s, 3H, -OCH₃), 6.89 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 7.08 (dd, 1H, *J* = 9.0/2.7 Hz, ArH), 7.34 (s, 1H, ArH), 7.43 (tt, 1H, *J* = 7.3/1.3 Hz, ArH), 7.48-7.51 (m, 2H, ArH), 8.02-8.04 (m, 2H, ArH), 8.60-8.61 (m, 2H, ArH), 10.40 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.5 (-OCH₃); 35.9 (CH₂); 93.5, 106.7, 109.6, 126.0 (2C), 128.7 (2C), 128.9, 132.5, 149.5 (tert. C); 113.1, 114.5, 132.4, 139.3, 140.3, 149.7, 154.1, 161.4, 171.8 (quart. C); C₂₁H₁₆N₄O₂ [356.39]; ber. C 70.78, H 4.53, N 15.72; gef. C 70.49, H 4.47, N 15.39; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; *t*_s: 3.72 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 50:50); λ_{max}: 268 und 335 nm; cLogP: 3.27 ± 1.26.

7,12-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]pyrimido[5',4':5,6]pyrido[2,3-d]azepin-6,9,11(10H)-trion (26a)

Nach AAV 3 aus 116 mg (0.500 mmol) 8-(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**47**) und 64 mg (0.50 mmol) 6-Aminouracil (**72**). Reaktionsdauer: 8 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 74 mg (50%) braunes Pulver.

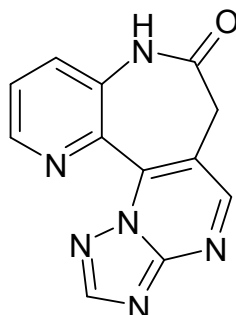
Schmp.: > 380 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3440 cm⁻¹, 3164 cm⁻¹ und 3123 cm⁻¹ (NH), 3044 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2831 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (breit) (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.62 (s, 2H, CH₂), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.2/4.3 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.7 Hz, ArH), 8.37 (s, 1H, Pyridin-H), 8.59-8.60 (dd, 1H, *J* = 4.4/1.7 Hz, ArH), 10.38 (s, 1H, NH), 11.53 (s, 1H, NH), 11.90 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.5 (CH₂); 125.0, 129.9, 136.5, 145.3 (tert. C); 110.1, 125.6, 135.2, 145.3, 150.4, 151.5, 156.8, 162.1, 171.3 (quart. C); C₁₄H₉N₅O₃ [295.25]; ber. C 56.95, H 3.07, N 23.72; gef. C 54.37, H 3.52, N 20.70; HRMS-EI (*m/z*): ber. 295.07053, gef. 295.07046; HPLC: Reinheit: 99.7% bei 254 nm, 98.9% bei 280 nm; *t*_s: 2.69 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O 20:80); λ_{max}: 336 nm; cLogP: -0.61 ± 0.39.

10,12-Dimethyl-7,12-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]pyrimido[5',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]azepin-6,9,11(10*H*)-trion (**26b**)



Nach AAV 3 aus 140 mg (0.600 mmol) 8-(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 95 mg (0.60 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2,4-dion. Reaktionsdauer: 7 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 75 mg (39%) hellbraunes Pulver.

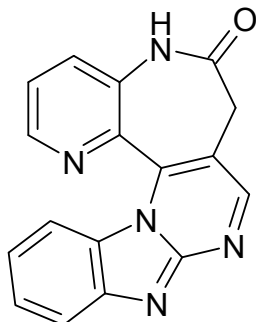
Schmp.: > 390 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3429 cm⁻¹ (NH), 3065 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2963 cm⁻¹ und 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1715 cm⁻¹, 1698 cm⁻¹ und 1663 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.63 (s, 3H, -NCH₃), (eine NCH₃-Gruppe ist vom Wasserpeak überlagert), 3.66 (s, 2H, CH₂), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8.3/4.4 Hz, ArH), 7.65 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.6 Hz, ArH), 8.47 (s, 1H, Pyridin-H), 8.65 (dd, 1H, *J* = 4.4/1.5 Hz, ArH), 10.34 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.1 (-NCH₃), 29.2 (-NCH₃); 38.3 (CH₂); 125.0, 129.9, 137.1, 145.6 (tert. C); 110.5, 125.7, 135.4, 145.4, 149.6, 151.0, 156.0, 160.7, 171.3 (quart. C); C₁₆H₁₃N₅O₃ [323.31]; ber. C 59.44, H 4.05, N 21.66; gef. C 57.19, H 3.94, N 20.29; HRMS-EI (m/z): ber. 323.10184, gef. 323.10089; HPLC: Reinheit: 99.9% bei 254 nm, 98.0% bei 280 nm; t_s: 2.64 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 15:85); λ_{max}: 226 und 340 nm; cLogP: 0.11 ± 0.79.

6,8-Dihydro-7*H*-pyrido[3,2-*b*][1,2,4]triazolo[5',1':2,3]pyrimido[4,5-*d*]azepin-7-on (**26c**)

Nach AAV 4 bei 140 °C aus 150 mg (0.650 mmol) 8-(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 56 mg (0.66 mmol) 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**91**). Reaktionsdauer: 10 min. Nach Extraktion mit Ethylacetat wird aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 31 mg (19%) rotbraune Kristalle.

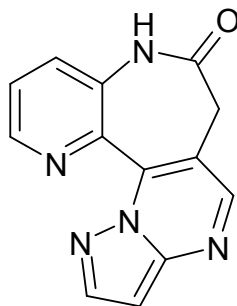
Schmp.: 325 °C; IR (KBr): 3117 cm⁻¹ (NH), 3070 cm⁻¹ und 3029 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2894 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1696 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.55 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz, CH₂), 3.84 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz, CH₂), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.4/4.5 Hz, ArH), 7.78 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.5 Hz, ArH), 8.68 (s, 1H, ArH), 8.70 (dd, 1H, *J* = 4.3/1.6 Hz, ArH), 9.06 (s, 1H, ArH), 10.67 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.7 (CH₂); 125.5, 129.7, 144.1, 154.1, 154.7 (tert. C); 118.0, 135.6, 137.5, 139.2, 154.2, 170.6 (quart. C); C₁₂H₈N₆O [252.23]; ber. C 57.14, H 3.20, N 33.32; gef. C 56.73, H 3.35, N 32.16; HRMS-EI (*m/z*): ber. 252.07597, gef. 252.07544; HPLC: Reinheit: 98.6% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm; *t*_s: 3.23 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 10:90); λ_{max}: 257 und 327 nm; cLogP: -0.49 ± 0.85.

5,7-Dihydro-6*H*-pyrido[2'',3'':6',7']azepino[4',5':5,6]pyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-6-on
(26d)



Nach AAV 4 bei 140 °C aus 150 mg (0.650 mmol) 8-(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 88 mg (0.66 mmol) 2-Amino-benzimidazol (**92**). Reaktionsdauer: 10 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 39 mg (20%) dunkelgelbe Kristalle.

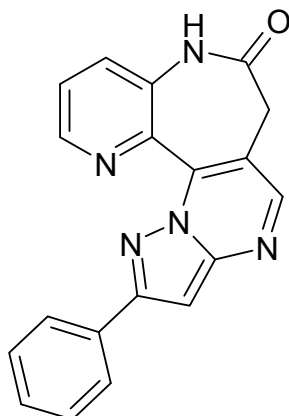
Schmp.: 330 °C; IR (KBr): 3190 cm⁻¹ (NH), 3109 cm⁻¹ und 3057 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2945 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.44 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 3.78 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz, CH₂), 7.00 (dt, 1H, *J* = 8.5/1.0 Hz, ArH), 7.18 (ddd, 1H, *J* = 8.5/7.1/1.2 Hz, ArH), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.1/6.8/1.1 Hz, ArH), 7.83 (dd, 1H, *J* = 8.4/4.4 Hz, ArH), 7.88-7.90 (m, 2H, ArH), 8.67 (dd, 1H, *J* = 4.2/1.5 Hz, ArH), 8.96 (s, 1H, Pyrimidin-H), 10.69 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.4 (CH₂); 116.4, 119.2, 120.6, 125.4, 127.0, 131.3, 144.5, 155.6 (tert. C); 117.1, 126.8, 135.8, 139.4, 140.6, 144.0, 150.7, 172.1 (quart. C); C₁₇H₁₁N₅O [301.30]; ber. C 67.77, H 3.68, N 23.24; gef. C 66.46, H 3.97, N 22.06; HRMS-EI (m/z): [M-H]⁺ ber. 300.08853, gef. 300.08732; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; t_s: 2.78 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 20:80); λ_{max}: 255 und 332 nm; cLogP: 1.66 ± 1.30.

6,8-Dihydro-7H-pyrazolo[5',1':2,3]pyrimido[4,5-d]pyrido[3,2-b]azepin-7-on (**26e**)

Nach AAV 4 bei 120 °C aus 150 mg (0.650 mmol) 8-(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**47**) und 71 mg (0.86 mmol) 3-Aminopyrazol (**93**). Reaktionsdauer: 10 min. Nach Extraktion mit Ethylacetat wird aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 85 mg (43%) gelbe Kristalle.

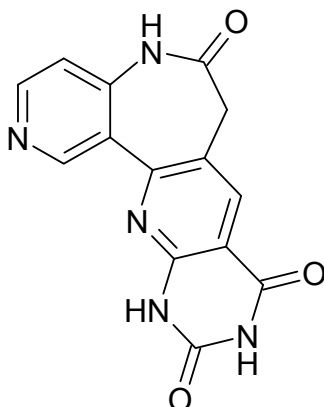
Schmp.: 322 °C; IR (KBr): 3196 cm⁻¹ (NH), 3107 cm⁻¹ und 3032 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2946 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.44 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz, CH₂), 3.71 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz, CH₂), 6.88 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 8.3/4.5 Hz, ArH), 7.76 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.7 Hz, ArH), 8.22 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 8.66 (dd, 1H, *J* = 4.5/1.7 Hz, ArH), 8.69 (s, 1H, Pyrimidin-H), 10.56 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.5 (CH₂); 96.8, 125.8, 130.4, 144.3, 144.6, 149.2 (tert. C); 116.7, 136.0, 138.0, 139.4, 148.6, 172.0 (quart. C); C₁₃H₉N₅O [251.25]; ber. C 62.15, H 3.61, N 27.87; gef. C 61.62, H 3.71, N 26.98; HRMS-EI (*m/z*): ber. 251.08070, gef. 251.08002; HPLC: Reinheit: 97.4% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm; *t*_s: 2.20 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 10:90); λ_{max} : 235, 304 und 360 nm; cLogP: 0.50 ± 0.82.

2-Phenyl-6,8-dihydro-7*H*-pyrazolo[5',1':2,3]pyrimido[4,5-*d*]pyrido[3,2-*b*]azepin-7-on
(26f)



Nach AAV 4 bei 120 °C aus 150 mg (0.650 mmol) 8-(Dimethylamino)methylen]-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**47**) und 105 mg (0.660 mmol) 3-Phenyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**94**). Reaktionsdauer: 10 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 153 mg (72%) gelbe Kristalle.

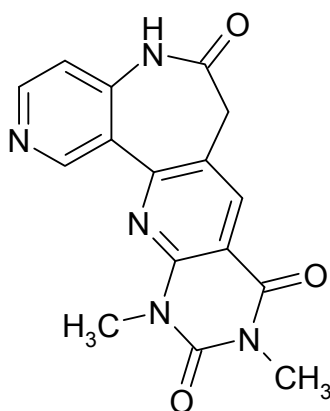
Schmp.: 290 °C; IR (KBr): 3210 cm⁻¹ (NH), 3158 cm⁻¹, 3122 cm⁻¹ und 3054 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2966 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.46 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz, CH₂), 3.71 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 7.39 (s, 1H, ArH), 7.42 (tt, 1H, *J* = 7.4/1.4 Hz, ArH), 7.46-7.49 (m, 2H, ArH), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.0/4.2 Hz, ArH), 7.78 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.6 Hz, ArH), 7.97-7.99 (m, 2H, ArH), 8.68 (s, 1H, ArH), 8.73 (dd, 1H, *J* = 4.4/1.7 Hz, ArH), 10.57 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.2 (CH₂); 93.3, 125.5, 125.7 (2C), 128.3 (2C), 128.5, 130.1, 144.3, 148.9 (tert. C); 116.5, 131.9, 135.7, 137.5, 139.0, 149.5, 154.1, 171.6 (quart. C); C₁₉H₁₃N₅O [327.35]; ber. C 69.72, H 4.00, N 21.39; gef. C 68.70, H 4.26, N 20.97; HRMS-EI (*m/z*): ber. 327.11200, gef. 327.11094; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; *t*_s: 3.44 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 30:70); λ_{max}: 271 und 343 nm; cLogP: 2.28 ± 1.25.

7,12-Dihydro-5H-pyrido[4,3-b]pyrimido[5',4':5,6]pyrido[2,3-d]azepin-6,9,11(10H)-trion (27a)

Nach AAV 3 aus 140 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**48**) und 65 mg (0.60 mmol) 6-Aminouracil (**72**). Reaktionsdauer: 12 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 73 mg (41%) hellgelbes Pulver.

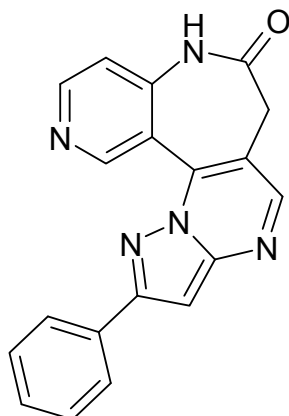
Schmp.: > 395 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3512 cm⁻¹, 3414 cm⁻¹ und 3181 cm⁻¹ (NH), 3042 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2832 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1696 cm⁻¹ (breit) (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, CH₂), 7.17 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, Pyridin-H), 8.57 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz, ArH), 9.08 (s, 1H, Pyridin-H), 10.69 (s, 1H, NH), 11.49 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.8 (CH₂); 115.2, 136.9, 150.6, 151.7 (tert. C); 109.8, 123.9, 124.4, 144.2, 150.4, 151.3, 155.6, 162.0, 171.0 (quart. C); C₁₄H₉N₅O₃ [295.25]; ber. C 56.95, H 3.07, N 23.72; gef. C 53.59, H 3.50, N 22.68; HRMS-EI (*m/z*): ber. 295.07053; gef. 295.07033; HPLC: Reinheit: 96.9% bei 254 nm, 95.0% bei 280 nm; *t*_s: 5.74 min, *t*_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O 20:80); λ_{max}: 233 und 335 nm; cLogP: -0.28 ± 0.41.

10,12-Dimethyl-7,12-dihydro-5H-pyrido[4,3-*b*]pyrimido[5',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]azepin-6,9,11(10*H*)-trion (**27b**)



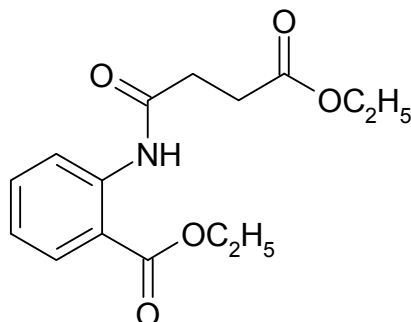
Nach AAV 3 aus 140 mg (0.600 mmol) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**48**) und 95 mg (0.60 mmol) 6-Amino-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2,4-dion. Reaktionsdauer: 7 h. Zur Reinigung wird das Produkt aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 81 mg (42%) beiges Pulver.

Schmp.: > 390 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3187 cm⁻¹ (NH), 3043 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2940 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1716 cm⁻¹ und 1681 cm⁻¹ (breit) (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34 (s, 3H, -NCH₃, teilweise vom Wasser-peak überlagert), 3.66 (s, 3H, -NCH₃), 3.72 (s, 2H, CH₂), 7.19 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 8.49 (s, 1H, Pyridin-H), 8.60 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, ArH), 9.22 (s, 1H, Pyridin-H), 10.73 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.1 (-NCH₃), 29.2 (-NCH₃); 38.6 (CH₂); 115.3, 137.5, 150.7, 151.8 (tert. C); 110.1, 124.1, 124.4, 144.2, 149.5, 151.0, 154.9, 160.6, 170.9 (quart. C); C₁₆H₁₃N₅O₃ [323.31]; ber. C 59.44, H 4.05, N 21.66; gef. C 58.99, H 4.10, N 21.22; HRMS-El (m/z): ber. 323.10184, gef. 323.10152; HPLC: Reinheit: 99.7% bei 254 nm, 99.3% bei 280 nm; t_s: 3.20 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 20:80); λ_{max}: 232 und 338 nm; cLogP: 0.44 ± 0.80.

2-Phenyl-6,8-dihydro-7H-pyrazolo[5',1':2,3]pyrimido[4,5-d]pyrido[4,3-b]azepin-7-on
(27f)

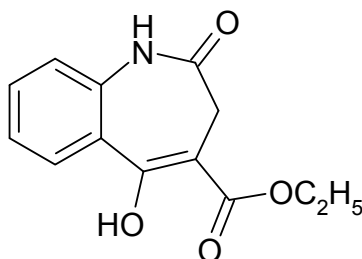
Nach AAV 4 bei 120 °C aus 176 mg (0.760 mmol) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**48**) und 124 mg (0.780 mmol) 3-Phenyl-1H-pyrazol-5-amin (**94**). Reaktionsdauer: 10 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 155 mg (62%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 340 °C; IR (KBr): 3208 cm⁻¹ (NH), 3122 cm⁻¹ und 3025 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1703 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.45 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, CH₂), 3.77 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, CH₂), 7.33 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, ArH), 7.40 (s, 1H, ArH), 7.44 (tt, 1H, *J* = 7.3/1.4 Hz, ArH), 7.49-7.51 (m, 2H, ArH), 8.01-8.03 (m, 2H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 8.67 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, ArH), 9.76 (s, 1H, ArH), 10.92 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.8 (CH₂); 94.0, 116.2, 126.1 (2C), 128.8 (2C), 129.1, 149.8, 151.1 152.4 (tert. C); 115.7, 116.1, 132.2, 137.5, 144.8, 149.6, 154.4, 171.6 (quart. C); C₁₉H₁₃N₅O [327.35]; ber. C 69.72, H 4.00, N 21.39; gef. C 69.39, H 4.22, N 20.83; HRMS-EI (m/z): [M-H]⁺ ber. 326.10419, gef. 326.10307; HPLC: Reinheit: 99.6% bei 254 nm, 98.2% bei 280 nm; t_s: 3.54 min, t_m(DMSO): 1.03 min (ACN:H₂O 35:65); λ_{max}: 226, 275 und 341 nm; cLogP: 2.61 ± 1.26.

2-[4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl]amino]benzoesäureethylester (**30**)

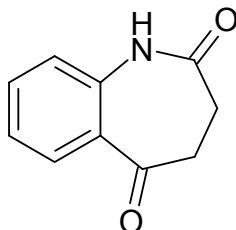
Nach AAV 5, Methode A aus 28.08 g (170.0 mmol) Anthranilsäureethylester (**28**) in 20 ml Pyridin und 75 ml Toluol mit 33.74 g (205.0 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**) in 25 ml Toluol. Reaktionsdauer: 2h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 39.39 g (79%) farblose Kristalle.

Schmp.: 60 °C (Lit.¹⁵³: 60 °C)

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**31**)

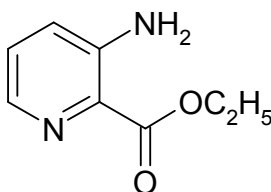
Durchführung nach AAV 6 aus 8.80 g (30.0 mmol) 2-[4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl]amino]benzoesäureethylester (**30**) und 6.02 g (150 mmol) Kaliumhydrid. Reaktionsdauer: Zutropfen 4 h, Rühren bei RT 2 h, Erhitzen bei 70-75 °C 1-2 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 5.49 g (74%) farblose Kristalle.

Schmp.: 209-211 °C (Lit.⁶⁶: 210-213 °C)

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (32)

3.71 g (15.0 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**31**) werden in 40 ml DMSO mit 0.5 ml Wasser bei 150 °C unter Stickstoffbegasung gerührt. Nach 1 h und nach 3 h werden erneut je 0.5 ml Wasser zuge tropft. Nach 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 300 ml Wasser. Nach 12 h Kühlung wird der gebildete Niederschlag abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 2.02 g (77%) farblose Kristalle.

Schmp.: 188 °C (Lit.¹⁵⁴: 187-188 °C)

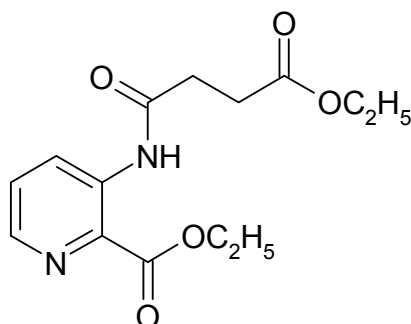
3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (34)

5.00 g (36.0 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**33**) werden in 70 ml absolutem Ethanol (getrocknet) mit 5-6 ml konz. Schwefelsäure für 72 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz im Vakuum auf ca. 20 ml reduziert. Ca. 30 g Eis werden hinzugefügt und der pH-Wert der Lösung wird unter Eiskühlung mit 25%iger Ammoniaklösung auf 8-9 eingestellt. Anschließend wird die Lösung viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Ausbeute beträgt 3.5 g (58%) eines farblosen Feststoffs. Dieser kann bei entsprechendem Schmelzpunkt direkt weiter umgesetzt

werden. Umkristallisation aus einer Ethanol/Petrolether-Mischung ergibt 1.68 g (28%) farblose Kristalle.

Schmp.: 130 °C (Lit.¹⁵⁵: 132 °C)

3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**35**)

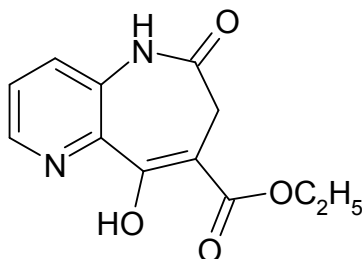


Nach AAV 5, Methode A aus 3.32 g (20.0 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**34**) und 4.11 g (25.0 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**). Reaktionsdauer: 4 h. Die Ausbeute beträgt 4.59 g (78%) eines farblosen Feststoffs.

Schmp.: 66 °C (Lit.⁷⁰: 68 °C)

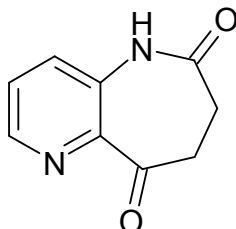
Nach AAV 5, Methode B aus 1.66 g (10.0 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**34**) und 2.06 g (12.5 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**). Reaktionsdauer: 10 h. Die Ausbeute beträgt 2.03 g (69%) eines farblosen Feststoffs.

Schmp.: 66 °C (Lit.⁷⁰: 68 °C)

9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-carbonsäureethylester (36)

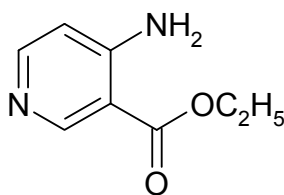
Nach AAV 6 aus 2.94 g (10.0 mmol) 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**35**). Reaktionsdauer: Zutropfen 2 h, Rühren bei RT 4 h, Erhitzen bei 70-75 °C 6 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 1.02 g (41%) farblose Kristalle.

Schmp.: 220 °C (Lit.⁷⁰: 221 °C)

7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (37)

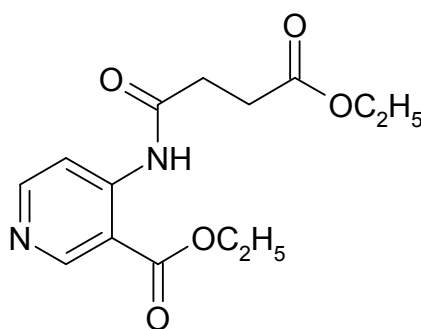
125 mg (0.500 mmol) 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-carbonsäureethylester (**36**) werden in 10 ml *N,N*-Dimethylformamid bei 150 °C unter Stickstoffbegasung für 12 h gerührt. Alle 30 min werden 2 Tropfen Wasser hinzugefügt. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 75 mg (85%) eines braunen Feststoffs (ungereinigt). Die Verbindung wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

Schmp.: 181 °C (Lit.⁷⁰: 186 °C)

4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (39)

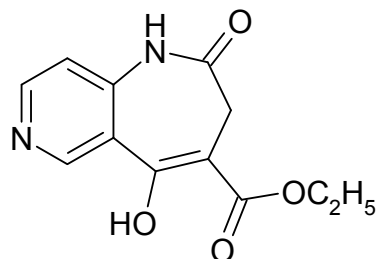
5.00 g (36.0 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**38**) werden in 70 ml absolutem Ethanol (getrocknet) mit 5-6 ml konz. Schwefelsäure für 72 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz im Vakuum auf ca. 20 ml reduziert. Ca. 30 g Eis werden der Lösung hinzugefügt und der pH-Wert wird unter Eiskühlung mit 25%iger Ammoniaklösung auf 8-9 eingestellt. Anschließend wird die Lösung viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Ausbeute beträgt 4.97 g (83%) eines farblosen Feststoffs, der ohne Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

Schmp.: 103 °C (Lit.⁶⁸: 100-105 °C)

4-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (40)

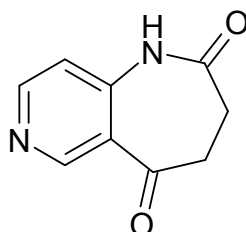
Nach AAV 5, Methode B aus 1.66 g (10.0 mmol) 4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**39**) und 2.06 g (12.5 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**29**). Reaktionsdauer: 10 h. Die Ausbeute beträgt 1.85 g (63%) eines farblosen Feststoffs.

Schmp.: 93 °C (Lit.⁶⁹: 94-95 °C)

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-4-carbonsäureethylester (**41**)

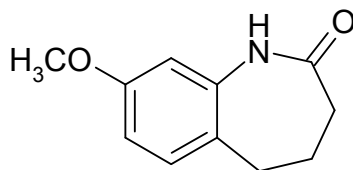
Nach AAV 6 aus 2.94 g (10.0 mmol) 4-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**40**). Reaktionsdauer: Zutropfen 2 h, Rühren bei RT 4 h, Erhitzen bei 70-75 °C 6-8 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 745 mg (30%) farblose Kristalle.

Schmp.: 200 °C (Lit.⁶⁹: 199 °C)

3,4-Dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**42**)

248 mg (1.00 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-4-carbonsäureethylester (**41**) werden in 35 ml *N,N*-Dimethylformamid bei 150 °C unter Stickstoffbegasung für 12 h gerührt. Alle 30 min werden 4 Tropfen Wasser hinzugefügt. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 158 mg (90%) eines braunen Feststoffs (ungereinigt), der ohne Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

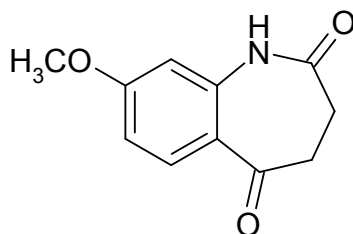
Schmp.: 212 °C (Lit.⁶⁹: 213-215 °C)

8-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-1-benzazepin-2-on (44)

In einem Dreihalskolben mit Thermometer und Gasableitung werden 4.40 g (25.0 mmol) Methoxytetralon (**43**) in 18 ml Eisessig gelöst. 3.19 g (49.0 mmol) Natriumazid* werden unter Rühren hinzugefügt. Man tropft über die Zeitdauer von 1 h 5.6 ml konz. Schwefelsäure dazu, wobei die Temperatur der Suspension durch Außenkühlung mit Wasser auf 25-30 °C zu halten ist. Anschließend wird auf 50-60 °C bis zur vollständigen Umsetzung (1 h) erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz langsam unter Rühren in 185 ml 10%ige Natriumcarbonat-Lösung gegossen (Vorsicht! Ausreichend großes Gefäß verwenden wegen starker Schaumbildung!). Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt und aus Aceton umkristallisiert (gegebenenfalls Heißfiltration durchführen). Die Ausbeute beträgt 1.77 g (37%) braune Kristalle.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2.

Schmp.: 130 °C (Lit.¹⁵⁶: 132-134 °C)

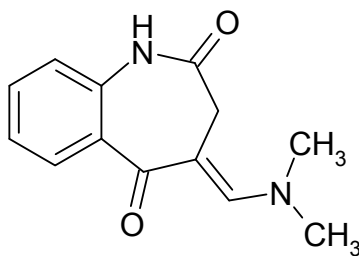
8-Methoxy-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (45)

1.15 g (6.00 mmol) 8-Methoxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-1-benzazepin-2-on (**44**) werden in 17 ml *tert*-Butanol gelöst. Es werden 50 ml Wasser, 5.37 g (34.0 mmol) Kaliumpermanganat und 8.72 g (34.0 mmol) Magnesiumnitrat-Hexahydrat hinzugefügt. Die Lösung wird 3 h unter Eiskühlung und für weitere 17 h in einem Wasserbad gerührt.

Unter Kühlung wird soviel einer Wasserstoffperoxid-Schwefelsäure-Lösung (aus 10 ml Wasserstoffperoxid 30%, 10 ml konz. Schwefelsäure und 80 ml Wasser) dazugegeben, bis der braune Reaktionsansatz farblos ist. Die Lösung wird in einen Scheidetrichter überführt und viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen werden diese je einmal mit gesättigter Natriumcarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Es werden 332 mg (27%) farblose Kristalle erhalten.

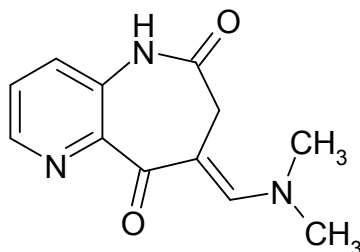
Schmp.: 203 °C (Lit.¹⁵⁷: 205 °C)

4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46**)



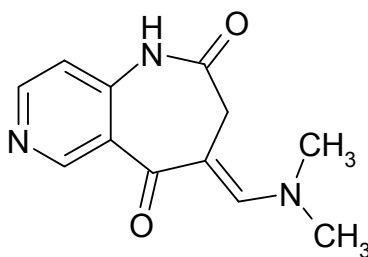
Nach AAV 7 aus 1.40 g (8.00 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**32**) und 30 ml DMF-DMA. Reaktionszeit: 2 h. Umkristallisation aus einem Ethanol/2-Propanol-Gemisch ergibt 1.00 g (55%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 220 °C (Lit.⁷²: 218-220 °C)

8-[(Dimethylamino)methyliden]-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (47)

Nach AAV 7 aus 468 mg (2.70 mmol) 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (37) und 8 ml DMF-DMA. Reaktionszeit: 2.5 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 261 mg (42%) rote Kristalle.

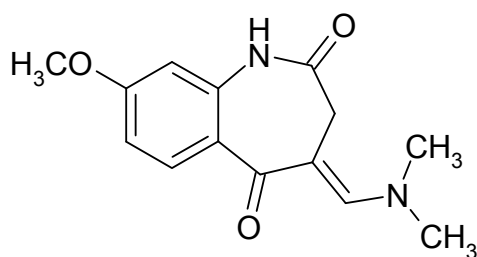
Schmp.: 265 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3217 cm^{-1} (NH), 2957 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1686 cm^{-1} und 1636 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.24 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 3.33 [CH₂, vom Wasserpeak überlagert, in CHCl₃- d_1 : 3.42 (s, 2H, CH₂)], 7.42 (dd, 1H, J = 8.3/4.3 Hz, ArH), 7.45 (dd, 1H, J = 8.3/1.8 Hz, ArH), 7.65 (s, 1H, C=H), 8.42 (dd, 1H, J = 8.4/1.8 Hz, ArH), 9.98 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 39.3 (2C, -N(CH₃)₂, nur im $^{13}\text{C-DEPT}$ -Spektrum sichtbar); 30.8 (CH₂); 125.0, 129.0, 145.1, 150.7 (tert. C); 99.7, 134.3, 148.6, 172.9, 186.2 (quart. C); C₁₂H₁₃N₃O₂ [231.25]; ber. C 62.33, H 5.67, N 18.17; gef. C 61.29, H 5.88, N 17.49; HRMS-EI (m/z): ber. 231.10077, gef. 231.10073; HPLC: Reinheit: 99.6% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm; t_s : 2.76 min, t_m (DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 20:80); λ_{max} : 257, 318 und 387 nm; cLogP: 0.98 \pm 1.12.

4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (48)

Nach AAV 7 aus 678 mg (3.80 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**42**) und 12 ml DMF-DMA. Reaktionszeit: 2.5 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 457 mg (52%) hellrote Kristalle.

Schmp.: 250 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3429 cm⁻¹ (NH), 3090 cm⁻¹ und 3024 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2834 cm⁻¹ und 2775 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1695 cm⁻¹ und 1646 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.24 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 3.32 (CH₂, vom Wasserpeak überlagert), 6.98 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, ArH), 7.64 (s, 1H, C=H), 8.44 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, ArH), 8.77 (s, 1H, Pyridin-H), 10.36 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 39.6 (2C, -N(CH₃)₂, nur im ¹³C-DEPT-Spektrum sichtbar); 31.2 (CH₂); 114.6, 150.7, 150.9, 152.0 (tert. C); 98.4, 127.1, 143.7, 172.8, 186.2 (quart. C); C₁₂H₁₃N₃O₂ [231.25]; ber. C 62.33, H 5.67, N 18.17; gef. C 61.91, H 5.72, N 17.75; HRMS-El (m/z): ber. 231.10077, gef. 231.10038; HPLC: Reinheit: 98.6% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm; t_s: 2.21 min, t_m(DMSO): 1.03 min (MeOH:H₂O+(Et₃NH)₂SO₄ 10:90); λ_{max}: 231, 268 und 378 nm; cLogP: 0.98 ± 0.91.

4-[(Dimethylamino)methyliden]-8-methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion
(49)



Nach AAV 7 aus 1.30 g (6.30 mmol) 8-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**45**) und 20 ml DMF-DMA. Reaktionszeit: 2.5 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 1.19 g (73%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 245 °C; IR (KBr): 3174 cm⁻¹ (NH), 3053 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2929 cm⁻¹, 2839 cm⁻¹ und 2802 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1684 cm⁻¹ und 1633 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (CHCl₃-*d*₁, 400 MHz): δ (ppm) = 3.26 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 3.42 (s, 2H, CH₂), 6.40 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.5 Hz, ArH), 7.74 (s,

^1H , C=H), 7.88 (s, 1H, NH), 7.93 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, ArH); ^{13}C -NMR ($\text{CHCl}_3\text{-}d_1$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 44.0 (2C, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 55.5 ($-\text{OCH}_3$); 31.7 (CH_2); 105.6, 110.9, 133.3, 150.9 (tert. C); 99.7, 125.9, 137.9, 162.3, 173.9, 189.0 (quart. C); $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ [260.29]; ber. C 64.60, H 6.20, N 10.76; gef. C 64.33, H 6.22, N 10.43; HPLC: Reinheit: 100.0% bei 254 nm, 100.0% bei 280 nm; t_s : 2.73 min, $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min (ACN: H_2O 20:80); λ_{max} : 244 und 360 nm; cLogP : 1.97 ± 1.12 .

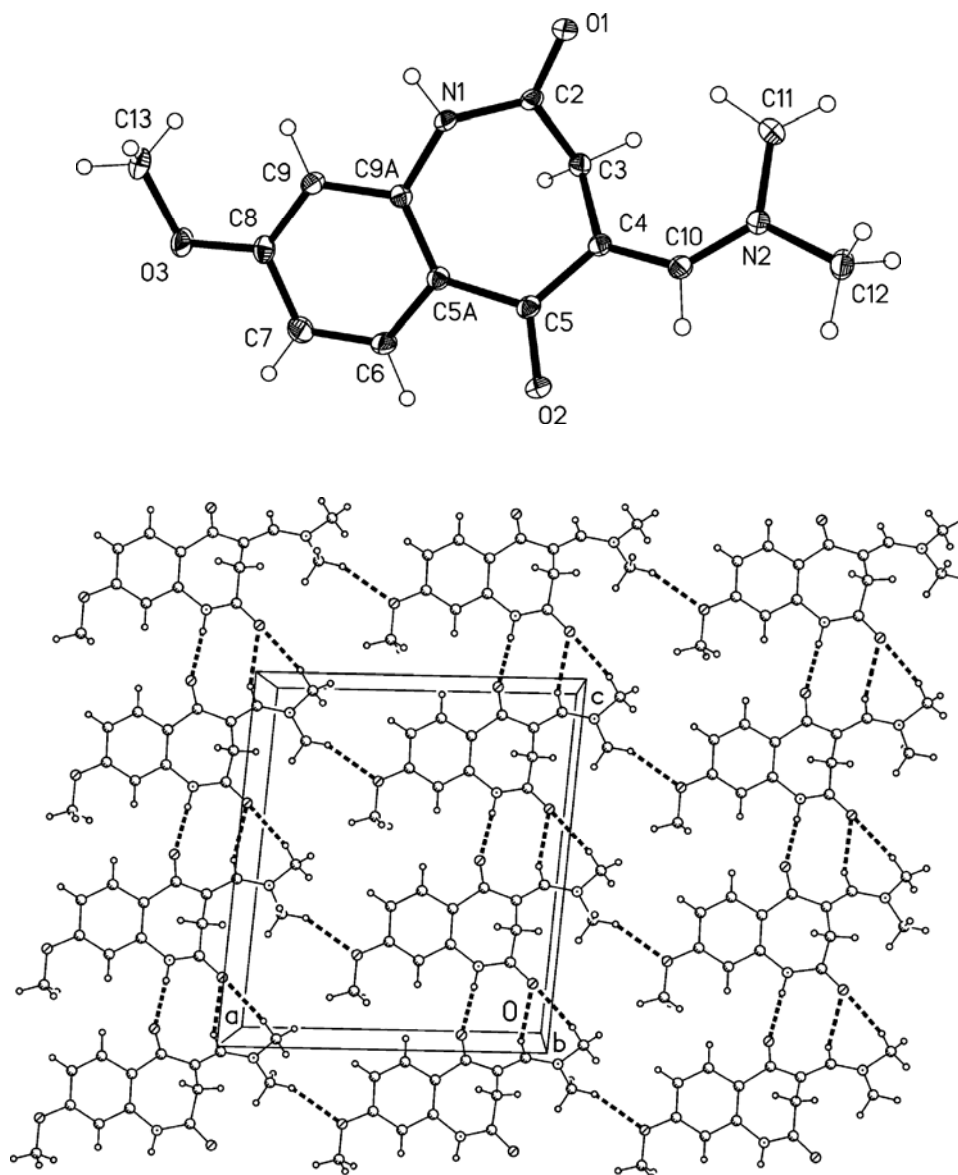


Abbildung 7-2: Röntgenkristallstruktur von 49^a

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Kristalldaten und Strukturverfeinerung

| | | |
|--|---|---------------------------|
| Summenformel: | $C_{14}H_{16}N_2O_3$ | |
| Mr: | 260.29 | |
| Temperatur: | 100(2) K | |
| Wellenlänge: | 0.71073 Å | |
| Kristallsystem: | Monoclinic | |
| Raumgruppe: | $P2_1/c$ | |
| Gitterkonstanten: | $a = 12.1971(7)$ Å | $\alpha = 90^\circ$ |
| | $b = 7.3482(3)$ Å | $\beta = 94.836(6)^\circ$ |
| | $c = 13.9020(7)$ Å | $\gamma = 90^\circ$ |
| Volumen: | $1241.56(11)$ Å ³ | |
| Z: | 4 | |
| Dichte (berechnet): | 1.393 Mg/m ³ | |
| Absorptionskoeffizient: | 0.099 mm ⁻¹ | |
| F(000): | 552 | |
| Kristallgröße: | $0.30 \times 0.30 \times 0.25$ mm ³ | |
| θ -Bereich für Datensammlung: | 2.94 bis 28.28° | |
| Limitierende Indices: | $16 \leq h \leq 16, -9 \leq k \leq 9, -18 \leq l \leq 18$ | |
| Zahl der Reflexe: | 23636 | |
| Unabhängige Reflexe: | 3069 [R(int) = 0.0355] | |
| Vollständigkeit bis $\theta = 28.28^\circ$: | 99.5% | |
| Absorptionskorrektur: | None | |
| Verfeinerungsmethode: | Full-matrix least-squares on F^2 | |
| Daten / Einschränkungen / Parameter: | 3069 / 0 / 179 | |
| Goodness-of-fit on F^2 : | 1.061 | |
| Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]: | $R1 = 0.0349, wR2 = 0.0937$ | |
| R indices (alle Daten): | $R1 = 0.0444, wR2 = 0.0958$ | |
| Größte Differenzpeaks: | 0.306 und -0.226 e.Å ⁻³ | |

Tabelle 7-7: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.^{a,b}

| | x | y | z | $U(\text{eq})$ |
|-------|------------|------------|-----------|----------------|
| N(1) | 2327.3(7) | 3416.7(12) | 2029.0(6) | 13.3(2) |
| C(2) | 1320.8(8) | 4097.3(13) | 2187.7(7) | 12.5(2) |
| C(3) | 1256.8(9) | 5063.1(13) | 3130.7(7) | 13.4(2) |
| C(4) | 1330.5(8) | 3679.6(14) | 3940.8(7) | 12.7(2) |
| C(5) | 2417.1(8) | 3055.3(14) | 4267.2(7) | 13.1(2) |
| C(5A) | 3352.9(8) | 3425.7(14) | 3660.0(7) | 12.5(2) |
| C(6) | 4407.0(9) | 3482.9(14) | 4157.0(7) | 15.9(2) |
| C(7) | 5356.2(9) | 3621.7(15) | 3700.9(8) | 18.8(2) |
| C(8) | 5290.4(8) | 3655.2(14) | 2692.6(8) | 15.8(2) |
| C(9) | 4272.6(9) | 3604.7(14) | 2170.5(7) | 13.9(2) |
| C(9A) | 3305.0(8) | 3517.2(13) | 2645.5(7) | 11.9(2) |
| C(10) | 468.4(8) | 2919.4(14) | 4384.4(7) | 13.2(2) |
| C(11) | -1179.8(9) | 4135.4(17) | 3432.7(8) | 22.1(3) |
| C(12) | -1348.5(8) | 2132.7(15) | 4826.0(8) | 17.3(2) |
| C(13) | 6253.6(10) | 3721.0(16) | 1268.1(8) | 20.4(2) |
| N(2) | -615.5(7) | 3075.6(12) | 4213.1(6) | 14.7(2) |
| O(1) | 529.6(6) | 3887.5(10) | 1588.1(5) | 17.3(2) |
| O(2) | 2643.1(6) | 2211.6(11) | 5042.6(5) | 18.3(2) |
| O(3) | 6269.2(6) | 3762.4(11) | 2294.8(6) | 21.0(2) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-8: Bindungslängen [Å]^{a,b}

| | | | |
|------------|------------|-------------|------------|
| N(1)-C(2) | 1.3607(14) | C(5A)-C(9A) | 1.4083(14) |
| N(1)-C(9A) | 1.4106(12) | C(6)-C(7) | 1.3699(16) |
| C(2)-O(1) | 1.2306(12) | C(7)-C(8) | 1.3975(15) |
| C(2)-C(3) | 1.4984(13) | C(8)-O(3) | 1.3597(13) |
| C(3)-C(4) | 1.5143(13) | C(8)-C(9) | 1.3847(14) |
| C(4)-C(10) | 1.3811(15) | C(9)-C(9A) | 1.4016(15) |
| C(4)-C(5) | 1.4393(14) | C(10)-N(2) | 1.3284(13) |
| C(5)-O(2) | 1.2539(12) | C(11)-N(2) | 1.4600(13) |
| C(5)-C(5A) | 1.5006(15) | C(12)-N(2) | 1.4608(14) |
| C(5A)-C(6) | 1.4079(13) | C(13)-O(3) | 1.4261(13) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-9: Bindungswinkel [°]^{a,b}

| | | | |
|------------------|------------|------------------|------------|
| C(2)-N(1)-C(9A) | 127.61(9) | C(7)-C(6)-C(5A) | 123.20(9) |
| O(1)-C(2)-N(1) | 120.72(10) | C(6)-C(7)-C(8) | 119.09(9) |
| O(1)-C(2)-C(3) | 123.80(10) | O(3)-C(8)-C(9) | 124.58(9) |
| N(1)-C(2)-C(3) | 115.48(8) | O(3)-C(8)-C(7) | 115.52(9) |
| C(2)-C(3)-C(4) | 109.18(8) | C(9)-C(8)-C(7) | 119.90(10) |
| C(10)-C(4)-C(5) | 116.47(9) | C(8)-C(9)-C(9A) | 120.51(9) |
| C(10)-C(4)-C(3) | 127.16(9) | C(9)-C(9A)-C(5A) | 120.56(9) |
| C(5)-C(4)-C(3) | 116.35(9) | C(9)-C(9A)-N(1) | 114.74(9) |
| O(2)-C(5)-C(4) | 123.95(9) | C(5A)-C(9A)-N(1) | 124.59(9) |
| O(2)-C(5)-C(5A) | 116.79(9) | N(2)-C(10)-C(4) | 131.96(9) |
| C(4)-C(5)-C(5A) | 119.26(9) | C(10)-N(2)-C(11) | 125.39(9) |
| C(6)-C(5A)-C(9A) | 116.69(9) | C(10)-N(2)-C(12) | 120.21(9) |
| C(6)-C(5A)-C(5) | 115.84(9) | C(11)-N(2)-C(12) | 114.40(9) |
| C(9A)-C(5A)-C(5) | 127.06(9) | C(8)-O(3)-C(13) | 117.88(8) |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-10: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

| | | | |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| C(9A)-N(1)-C(2)-O(1) | -179.01(9) | C(6)-C(7)-C(8)-C(9) | 1.97(16) |
| C(9A)-N(1)-C(2)-C(3) | 0.03(15) | O(3)-C(8)-C(9)-C(9A) | -179.18(9) |
| O(1)-C(2)-C(3)-C(4) | 107.12(11) | C(7)-C(8)-C(9)-C(9A) | -0.10(16) |
| N(1)-C(2)-C(3)-C(4) | -71.88(11) | C(8)-C(9)-C(9A)-C(5A) | -1.86(15) |
| C(2)-C(3)-C(4)-C(10) | -97.51(12) | C(8)-C(9)-C(9A)-N(1) | -178.14(9) |
| C(2)-C(3)-C(4)-C(5) | 80.79(11) | C(6)-C(5A)-C(9A)-C(9) | 1.86(14) |
| C(10)-C(4)-C(5)-O(2) | -16.38(15) | C(5)-C(5A)-C(9A)-C(9) | -170.40(9) |
| C(3)-C(4)-C(5)-O(2) | 165.13(9) | C(6)-C(5A)-C(9A)-N(1) | 177.75(9) |
| C(10)-C(4)-C(5)-C(5A) | 163.95(9) | C(5)-C(5A)-C(9A)-N(1) | 5.49(16) |
| C(3)-C(4)-C(5)-C(5A) | -14.54(13) | C(2)-N(1)-C(9A)-C(9) | -148.16(10) |
| O(2)-C(5)-C(5A)-C(6) | -24.85(13) | C(2)-N(1)-C(9A)-C(5A) | 35.73(15) |
| C(4)-C(5)-C(5A)-C(6) | 154.84(9) | C(5)-C(4)-C(10)-N(2) | -174.09(10) |
| O(2)-C(5)-C(5A)-C(9A) | 147.46(10) | C(3)-C(4)-C(10)-N(2) | 4.21(18) |
| C(4)-C(5)-C(5A)-C(9A) | -32.85(15) | C(4)-C(10)-N(2)-C(11) | 2.08(18) |
| C(9A)-C(5A)-C(6)-C(7) | 0.05(16) | C(4)-C(10)-N(2)-C(12) | -178.36(10) |
| C(5)-C(5A)-C(6)-C(7) | 173.20(10) | C(9)-C(8)-O(3)-C(13) | -3.57(15) |
| C(5A)-C(6)-C(7)-C(8) | -1.96(17) | C(7)-C(8)-O(3)-C(13) | 177.32(9) |
| C(6)-C(7)-C(8)-O(3) | -178.87(10) | | |

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-11: Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °]^{a,b}

| D-H...A | d(D-H) | d(H...A) | d(D...A) | <(DHA) |
|-----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| N(1)-H(01)...O(2)#1 | 0.881(13) | 1.989(13) | 2.8577(11) | 168.7(12) |
| C(10)-H(10)...O(1)#2 | 0.95 | 2.48 | 3.3339(12) | 150.2 |
| C(12)-H(12A)...O(1)#2 | 0.98 | 2.36 | 3.2960(13) | 158.8 |
| C(11)-H(11B)...O(3)#3 | 0.98 | 2.50 | 3.3806(13) | 149.0 |

Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 $x, -y+1/2, z-1/2$

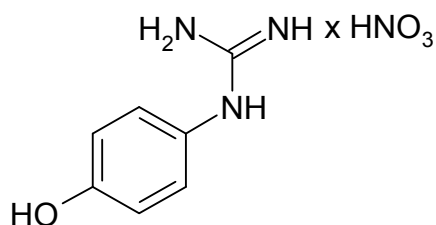
#2 $x, -y+1/2, z+1/2$

#3 $x-1, y, z$

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

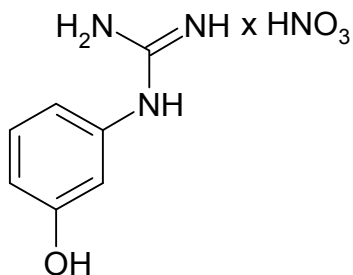
^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

N-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51a**)



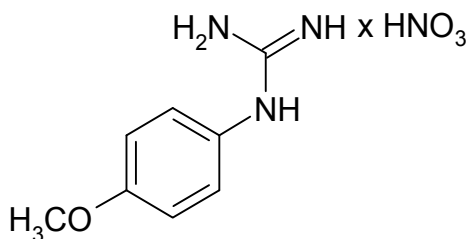
Nach AAV 8 aus 4.37 g (40.0 mmol) 4-Aminophenol (**50a**). Reaktionsdauer: 19 h. Umkristallisation aus 2-Propanol und anschließende Heißfiltration ergibt 1.63 g (19%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 202 °C (Lit.⁶¹: 201 °C)

N-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51b**)

Nach AAV 8 aus 4.37 g (40.0 mmol) 3-Aminophenol (**50b**). Reaktionsdauer: 19 h.
Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 5.23 g (61%) rotbraune Kristalle.

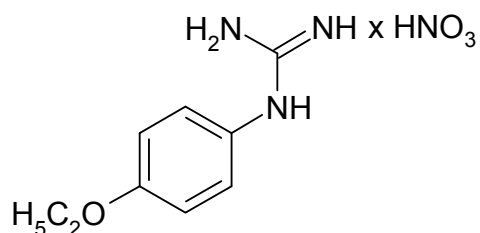
Schmp.: 130 °C (Lit.⁶¹: 132-133 °C)

N-(4-Methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51c**)

Nach AAV 8 aus 4.93 g (40.0 mmol) *p*-Anisidin (**50c**). Reaktionsdauer 18 h.
Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 5.29 g (58%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 210 °C (Lit.⁶¹: 213 °C)

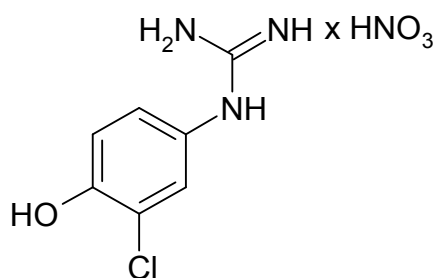
N-(4-Ethoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51d**)



Nach AAV 8 aus 5.49 g (40.0 mmol) *p*-Phenitidin (**50d**). Reaktionsdauer: 20 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 7.62 g (79%) rosafarbene Kristalle.

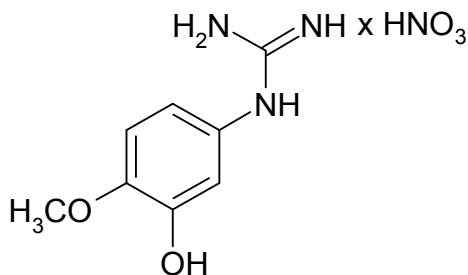
Schmp.: 168 °C (Lit.⁶¹: 167 °C)

N-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**51e**)



Nach AAV 8 aus 5.31 g (37.0 mmol) 4-Amino-2-chlorphenol (**50e**) in 10 ml Ethanol 96% und 3.4 ml konz. Salpetersäure und 4.8 ml 50%iger wässriger Cyanamid-Lösung. Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 5.24 g (57%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 220 °C unter Zersetzung (Lit.⁶¹: 223 °C unter Zersetzung)

N-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (51f)

Nach AAV 8 aus 5.57 g (40.0 mmol) 5-Amino-2-methoxyphenol (**50f**). Reaktionsdauer: 21 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 8.19 g (84%) braune Kristalle.

Schmp.: 195 °C (Lit.⁶¹: 197 °C)

Anhang zu Kapitel 7.2: Gefahrstoffverzeichnis

Im Folgenden sind Chemikalien aufgeführt, bei deren Verwendung besondere Gefahren zu beachten sind. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien müssen unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsregeln (R- und S-Sätze) gehandhabt werden.

Anilin und seine Derivate: T(+) (Sehr) Giftig, N Umweltgefährdend

R 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68:

Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. - Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. - Gefahr ernster Augenschäden. - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. - Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken. - Sehr giftig für Wasserorganismen. - Irreversibler Schaden möglich.

S 26-27-36/37/39-45-46-61-63:

Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. - Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen). - Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder

Etikett vorzeigen. - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen. - Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.

Brom: T+ Sehr giftig, C Ätzend, N Umweltgefährdend

R 26-35-50:

Sehr giftig beim Einatmen. - Verursacht schwere Verätzungen. - Sehr giftig für Wasserorganismen.

S 7/9-26-45-61:

Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen). - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

N,N-Dimethylformamid: T Giftig

R 61-E20/21-36:

Kann das Kind im Mutterleib schädigen. - Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut. - Reizt die Augen.

S 53-45:

Exposition vermeiden. - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Kaliumhydrid: F Leicht entzündlich, C Ätzend

R 14/15-34:

Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. - Verursacht Verätzungen.

S 7/8-26-36/37/39-43.6-45:

Behälter trocken und dicht geschlossen halten. - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. - Zum Löschen Sand verwenden, kein Wasser verwenden. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Natrium: F Leicht entzündlich, C Ätzend

R 14/15-34:

Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. - Verursacht Verätzungen.

S 5.3-8-43.7-45:

Unter Paraffinöl aufbewahren. - Behälter trocken halten. - Zum Löschen Metallbrandpulver verwenden, kein Wasser verwenden. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Natriumazid: T+ Sehr giftig, N Umweltgefährdend

R 28-32-50/53:

Sehr giftig beim Verschlucken. - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

S 28.1-45-60-61:

Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen). - Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Natriumhydrid, 60%ige Dispersion in Mineralöl: F Leichtentzündlich, C Ätzend

R 15-34:

Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. - Verursacht Verätzungen.

S 7/8-26-36/37/39-43.6-45:

Behälter trocken und dicht geschlossen halten. - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. - Zum Löschen Sand verwenden, kein Wasser verwenden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Phenylhydrazin: T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-E23/24/25-36/38-43-E48/23/24/25-50-68:

Kann Krebs erzeugen. - Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. - Reizt die Augen und die Haut. - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. - Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken. - Sehr giftig für Wasserorganismen. - Irreversibler Schaden möglich.

S 53-45-61:

Exposition vermeiden. - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen). - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

7.3 Biologische Daten

7.3.1 Proteinkinase-Assay (ProQinase)

In-vitro-Assay

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität getestet.

Die inhibitorische Wirkung der Substanzen wurde an 15 tumorrelevanten Proteinkinasen untersucht (AKT1, ARK5, Aurora B, B-RAF-VE, MET, PLK1, PRK1, SAK, TRK-B, CK2-alpha1, AXL, FAK, IGF1-R, SRC und VEGF-R2) sowie an der essenziellen Insulin-Rezeptor Kinase (INS-R).

Für alle getesteten Verbindungen wurden IC₅₀-Werte ermittelt, indem die Phosphorylierungsaktivitäten der Kinasen an den jeweiligen Substraten bestimmt wurden. Dazu wurde die Einlagerung von radioaktiv markiertem Phosphat ([γ -³³P]-ATP) in die Substrate gemessen.

Die verwendeten Proteinkinasen wurden in Sf9-Insektenzellen oder in E.coli als humane rekombinante GST-fusion Proteine oder als His-tagged Proteine exprimiert. Die Kinasen wurden anschließend durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose (Sigma) oder an Ni-NTH-Agarose (Qiagen) isoliert und gereinigt. Die Reinheit wurde mittels SDS-Page/Silberfärbung überprüft und die Identität der isolierten Kinasen wurde mittels Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern oder mittels Massenspektrometrie sichergestellt.

Die Aktivität der 16 Kinasen wurde mit dem radiometrischen ³³PanQinase® Activity Assay gemessen. Alle Kinaseassays wurden in 96-well FlashPlates™ der Firma Perkin Elmer/NEN (Boston, MA, USA) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde in 4 Schritten in der folgenden Reihenfolge pipettiert:

- 20 µl Standardpuffer
- 5 µl ATP-Lösung (in H₂O)
- 5 µl Probelösung (zu testende Verbindung in 10 % DMSO)
- 20 µl einer Mischung aus 10 µl Substrat- und 10 µl Enzymlösung

Der Assay für alle Enzyme enthält 60 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na-ortho-Vanadat, 1.2 mM DTT, 50 µM PEG₂₀₀₀₀, 1 µM [γ-³³P]-ATP (ca. 8 x 10⁵ cpm/well).

Für die 16 untersuchten Kinasen wurden unterschiedliche Enzym- und Substratkonzentrationen verwendet (Tab. 7-12).

Tabelle 7-12: ³³PanQinase® Activity Assay

| Kinase | Kinase- Konzentration [ng/50 µl] | Substrat | Substrat- Konzentration [ng/50 µl] |
|-------------|--|---|--|
| AKT1 | 50 | GSK3 (14-21), Lot 006 | 1000 |
| ARK5 | 100 | RB ER-CHKtide, PR080711 | 1000 |
| Aurora B | 100 | tetra(LRRWSLG) | 1000 |
| B-RAF-VE | 20 | MEK1-KM (Lot 021) | 250 |
| INS-R | 25 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| MET | 100 | Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr) _{6:2:5:1} | 125 |
| PLK1 | 30 | RB ER-CHKtide, PR080711 | 2000 |
| PRK1 | 200 | Histone H2B | 250 |
| SAK | 100 | P38-alpha KA, Lot 001 | 2000 |
| TRK-B | 10 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| CK2-alpha 1 | 50 | Casein | 1000 |
| AXL | 50 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| FAK | 200 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| IGF1-R | 20 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| SRC | 10 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |
| VEGF-R2 | 50 | Poly(Glu,Tyr) _{4:1} | 125 |

Die Reaktionsmischungen wurden bei 30 °C für 80 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 2%igen (v/v) Phosphorsäure gestoppt. Die Mikrotiterplatten wurden zweimal mit je 200 µl einer 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Die Einlagerung des radioaktiven ³³P_i in das jeweilige Substrat

wurde mit einem Mikroplatten-Szintillationszähler (Microbeta Trilux, Wallac) bestimmt. Alle Assays wurden mit einem Beckman Coulter/Sagian-Roboter System durchgeführt.

Zur Bestimmung der 100 %-Kinaseaktivität wurden zwei Werte bestimmt, der *low control*-Wert sowie der *high control*-Wert. Als *low control* wurden Proben vermessen, die nur Substrat, aber weder Enzym noch Inhibitor enthielten. Dieser Wert repräsentiert die unspezifische Bindung von radioaktivem Material an die Mikrotiterplatten. Die *high control* stellen Proben mit Substrat und Enzym, aber ohne Inhibitor dar, mit denen die uneingeschränkte Enzymaktivität gemessen wird. Die Differenz aus *high* und *low control* ergibt die 100%ige Enzymaktivität. Die Berechnung der Restaktivität erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100 \%$$

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden die Restaktivitäten von 10 Inhibitor-Konzentrationen (0.1 mM, 30.0 µM, 10.0 µM, 3.0 µM, 1.0 µM, 0.3 µM, 0.1 µM, 30.0 nM, 10.0 nM, 3.0 nM) ermittelt. Daraus erfolgte die Berechnung der IC₅₀-Werte mit dem Programm Quattro Workflow V2.1.6.4 (Quattro Research GmbH, München). Die IC₅₀-Werte der getesteten Verbindungen sind in den Tabellen 7.13 - 7.16 aufgeführt.

In Kapitel 4 werden die IC₅₀-Werte in Diagrammen als pIC₅₀-Werte angegeben. Die Umrechnung erfolgte aus den IC₅₀-Werten [M] nach folgender Formel:

$$\text{pIC}_{50} = -\log_{10} \text{IC}_{50}$$

Die Assay-Qualität wurde durch die Bestimmung des Z'-Faktors überprüft, der für die Kontrollproben (*low control* und *high control*) jeder Mikrotiterplatte (n=8) ermittelt wurde.¹⁵⁸ Für Z'-Faktoren unter 0.4 wird eine Wiederholung des Assays gefordert. Bei den Vermessungen der hier vorgestellten Substanzen lag kein Z'-Faktor unter 0.43, sondern meist über 0.60, was auf eine gute bis exzellente Assay-Qualität schließen lässt.

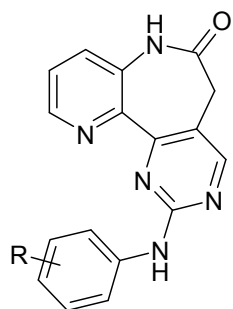
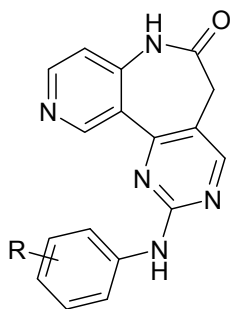
Zellulärer VEGF-R2 Phosphorylierungs-Assay

Der VEGF-R2 Phosphorylierungs-Assay wurde ebenfalls von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, durchgeführt. 48-well Zellkulturplatten wurden dazu mit HUVE-Zellen (*human umbilical vein endothelium cells*, HUVEC) beimpft. Über Nacht kam es in endotheliale Medium (Promocell) zur Anheftung der Zellen. Daraufhin wurden sie unter Hungerbedingungen in demselben Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert. Zur Durchführung des Assays wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen für je 90 min behandelt (DMSO-Konzentration 1 %). Anschließend wurde durch Zugabe von 100 ng/ml VEGF₁₆₅ (ProQinase) die VEGF-R2 Autophosphorylierung bei Raumtemperatur aktiviert. Nach 3 min wurden die Zellen lysiert und ein Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) mit dem Zelllysate beladen. Die ELISA-Mikrotiterplatte war mit dem *coating*-Antikörper VEGF-R2-AK 3G2 beschichtet. Der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus des gebundenen VEGF-R2 wurde mit dem biotinylierten pY-99-Antikörper (Santa Cruz) detektiert. Als Detektions-Antikörper wurde mit Meerrettichperoxidase markiertes Streptavidin eingesetzt. Durch Zugabe von TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) kam es schließlich zu einer farbgebenden Reaktion. Aus den gemessenen Absorptionen wurde der Phosphorylierungsgrad [%] errechnet. Dazu wurden nicht-inhibierte, mit DMSO behandelte Zellen als *high control* (100 %) und mit 10^{-5} M Staurosporin behandelte Zellen als *low control* (0 %) betrachtet. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte mit dem Programm Prism5, wobei sigmoidale *dose-response* Kurven angenommen wurden.

Alle Verbindungen wurden zweimal getestet. Die Z'-Faktoren waren > 0.50, meist > 0.60, was auf eine gute Assay-Qualität schließen lässt.

Sphäroid-basierter zellulärer Angiogenese-Assay

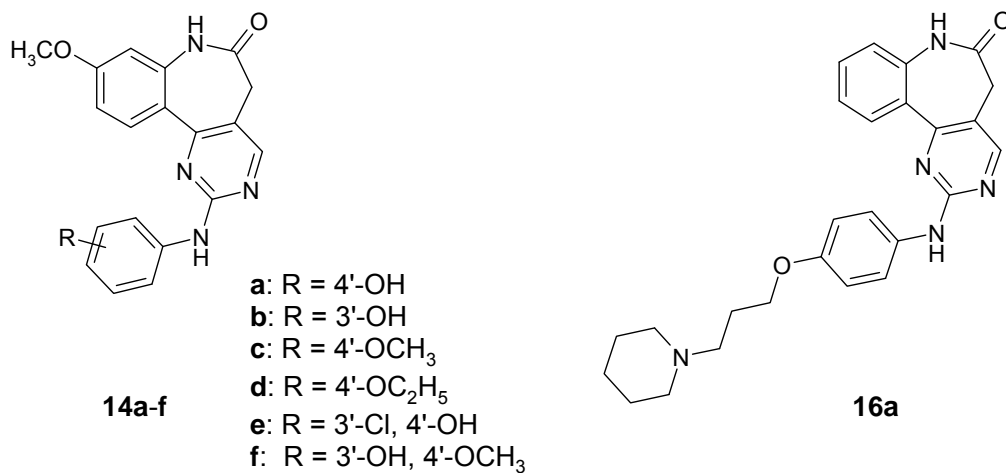
Die Durchführung erfolgte ebenfalls von der ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg. Nach einer Vorschrift von Korff und Augustin wurden Zellsphäroide durch Aggregation von humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (*human umbilical vein endothelium cells*, HUVEC) gewonnen.¹⁴⁵ 0.9 ml einer Kollagen-Lösung wurden mit 50 HUVEC-Sphäroiden beimpft und in 24-well Zellkulturplatten pipetiert, wo es zur Polymerisation kam. Nach 30 min wurde der stimulierende Wachstumsfaktor VEGF-A in einer Endkonzentration von 25 ng/ml sowie die zu testenden Substanzen in 7 verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0.3 μ M, 0.1 μ M, 30 nM, 10 nM) dem Sphäroid-Gel hinzugefügt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 4%igem Paraformaldehyd wurde die Zellsprossung abgebrochen. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Korff und Augustin.¹⁴⁶ Die Intensität der Zellsprossung wurde mittels eines Bild-Analyse-Systems quantifiziert, wobei die kumulierten Zellspross-Längen der Sphäroide mit einem invertierten Mikroskop und der digitalen Abbildungs-Software Analysis 3.2 (Soft imaging system, Münster, Germany) bestimmt wurden. Für jede Inhibitor-Konzentration wurde der Mittelwert der kumulierten Zellspross-Längen von 10 zufällig ausgewählten Sphäroiden sowie die Standardabweichung angegeben.

Tabelle 7-13: IC₅₀-Werte [μM] der Anilinopyrimidine **12** und **13** an 16 Kinasen^a**12a-e****13a-e**

- a:** R = 4'-OH
b: R = 3'-OH
c: R = 4'-OCH₃
d: R = 4'-OC₂H₅
e: R = 3'-Cl, 4'-OH

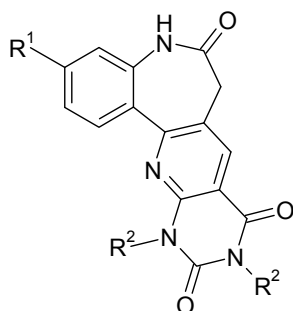
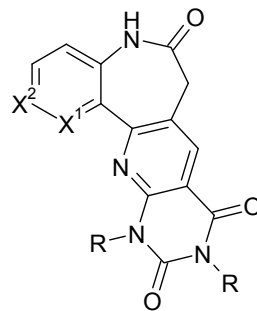
| | 12a | 12b | 12c | 12d | 12e | 13a | 13b | 13c | 13d | 13e |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| AKT1 | | | | | | | | | | |
| ARK5 | | | | | | 41 | 17 | 87 | 43 | 22 |
| Aurora B | 98 | 75 | | | 26 | 7.2 | 6.9 | 16 | 11 | 3.3 |
| AXL | | 96 | | | 20 | 23 | 17 | 19 | 17 | 9.6 |
| B-RAF VE | | | | | | 53 | 57 | | 38 | 18 |
| CK2-α1 | | | | | | | | | | |
| FAK | | 63 | 75 | 98 | 42 | 1.3 | 1.6 | 3.1 | 1.2 | 1.5 |
| IGF1-R | | | | | 14 | | 48 | | 74 | 25 |
| INS-R | | | | | | | | | | |
| MET | | | | | 82 | | | 91 | 77 | 59 |
| PLK1 | 55 | | | | | 2.6 | 2.3 | 2.5 | 1.7 | 1.4 |
| PRK1 | | | | | 76 | | | | | 53 |
| SAK | 90 | 60 | 88 | 77 | 19 | 5.4 | 6.0 | 13 | 7.6 | 4.4 |
| SRC | 91 | 40 | 55 | | 10 | 4.3 | 3.2 | 5.7 | 4.2 | 1.3 |
| TRK-B | 38 | 21 | 27 | 51 | 6.0 | 2.8 | 1.5 | 4.8 | 3.9 | 1.6 |
| VEGF-R2 | 2.7 | 2.6 | 1.5 | 2.0 | 0.67 | 0.13 | 0.14 | 0.19 | 0.099 | 0.087 |

^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

Tabelle 7-14: IC₅₀-Werte [μM] der Anilinopyrimidine **14** und **16a** an 16 Kinasen^a

| | 14a | 14b | 14c | 14d | 14e | 14f | 16a |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| AKT1 | | | | | | | |
| ARK5 | 35 | 5.3 | 0.55 | 72 | 1.1 | 6.7 | 4.7 |
| Aurora B | 0.96 | 0.88 | 1.0 | 6.9 | 0.37 | 0.73 | 11 |
| AXL | 2.2 | 1.7 | 70 | 3.2 | 0.72 | 2.1 | 0.89 |
| B-RAF VE | | 11 | 0.55 | | 6.3 | 19 | 63 |
| CK2-α1 | | | | | | | |
| FAK | 0.44 | 0.30 | 0.53 | 0.60 | 0.22 | 0.24 | 0.43 |
| IGF1-R | 45 | 13 | 26 | | 3.4 | 11 | 5.3 |
| INS-R | | | | | | | 34 |
| MET | | 35 | 0.69 | | 51 | | |
| PLK1 | 0.75 | 0.84 | 0.35 | 0.73 | 0.36 | 0.14 | 1.1 |
| PRK1 | | | | 6.3 | | | |
| SAK | 1.6 | 1.3 | 0.88 | 1.2 | 0.50 | 0.8 | 2.8 |
| SRC | 1.3 | 0.76 | 2.2 | 3.3 | 0.73 | 0.96 | 1.1 |
| TRK-B | 0.51 | 0.34 | 0.85 | 1.7 | 0.17 | 0.36 | 0.63 |
| VEGF-R2 | 0.028 | 0.015 | 0.050 | 0.052 | 0.011 | 0.018 | 0.026 |

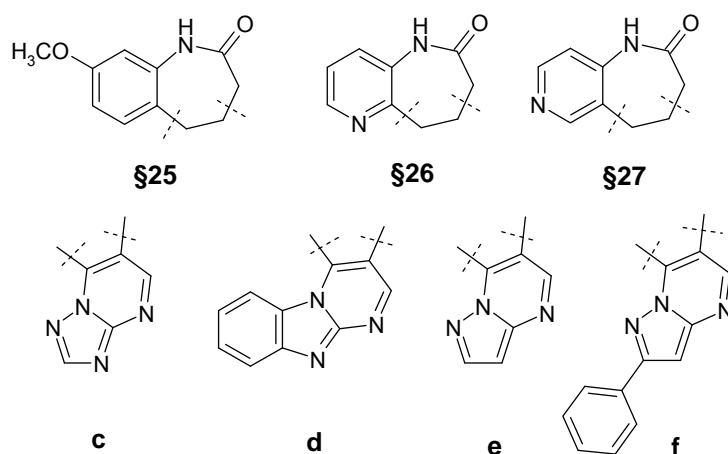
^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

Tabelle 7-15: IC₅₀-Werte [μM] von **24a-b**, **25a-b**, **26a-b** sowie **27a-b** an 16 Kinasen^a**24a:** R¹ = H, R² = H**24b:** R¹ = H, R² = CH₃**25a:** R¹ = OCH₃, R² = H**25b:** R¹ = OCH₃, R² = CH₃**26a:** X¹ = N, X² = CH, R = H**26b:** X¹ = N, X² = CH, R = CH₃**27a:** X¹ = CH, X² = N, R = H**27b:** X¹ = CH, X² = N, R = CH₃

| | 24a | 24b | 25a | 25b | 26a | 26b | 27a | 27b |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| AKT1 | | | | | | | | |
| ARK5 | | | | | | | | |
| Aurora B | | | | | | | | |
| AXL | | | 76 | | 71 | 63 | | |
| B-RAF VE | | | | | | | | |
| CK2-α1 | | | | | | | | |
| FAK | | | | | | | | |
| IGF1-R | | | 90 | | 32 | 53 | | |
| INS-R | | | | | | | | |
| MET | | | 92 | | | | | |
| PLK1 | | | | | | | | |
| PRK1 | | | | | | 85 | | |
| SAK | | | 69 | | | | | |
| SRC | | | | | 39 | 46 | 97 | |
| TRK-B | | | | | 49 | 52 | | |
| VEGF-R2 | | | | | 66 | | | |

^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

Tabelle 7-16: IC₅₀-Werte [μM] der *d*-anellierten 1-Benzazepinone **25c-f** und der azaanalogen Verbindungen **26c-f** und **27f** an 16 Kinasen^a



| | 25c | 25d | 25e | 25f | 26c | 26d | 26e | 26f | 27f |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| AKT1 | | | | 15 | | | | | |
| ARK5 | | | | 11 | | | | | 41 |
| Aurora B | | | 79 | 43 | | | | 94 | 43 |
| AXL | | | | 9.6 | | | | | |
| B-RAF VE | | 61 | | | | | | | |
| CK2-α1 | | | | | | | | | |
| FAK | | 100 | 49 | 12 | | | 87 | 90 | 66 |
| IGF1-R | 95 | 82 | 59 | 6.1 | 63 | 66 | 74 | 72 | |
| INS-R | | | | 11 | | | | | |
| MET | | | | 13 | | | | | |
| PLK1 | | | | 17 | | | | | |
| PRK1 | | | | 9.8 | | | | | |
| SAK | | | | 43 | | | | | 64 |
| SRC | 41 | 63 | 23 | 6.2 | 59 | 89 | 71 | 63 | 43 |
| TRK-B | 66 | 59 | 24 | 4.1 | 55 | 62 | 59 | 30 | 10 |
| VEGF-R2 | | | 8.6 | 1.8 | | | 87 | 16 | 2.0 |

^a Fehlende Werte sind mit IC₅₀-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

7.3.2 In-vitro-Tumorzelllinien-Screening (NCI)

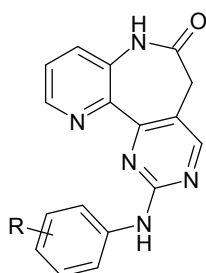
Einige Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt worden sind, wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht.^{135, 159, 160}

Die Verbindungen wurden zunächst in einem *one-dose 60 cell line assay* getestet, und zwar in einer Konzentration von 10^{-5} M. Dazu wurden 60 humane Tumorzelllinien verwendet, die neun verschiedene Krebsarten repräsentieren (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolonkarzinom, Brust- und Ovarial-Krebs, Leukämie, Nierenkarzinom, Melanom, Prostata- und ZNS-Krebs). Das Testergebnis der untersuchten Substanzen wird als *one dose mean graph* angegeben. Abbildung und Beschreibung eines *one dose mean graph* erfolgt in Kapitel 4.3.3 (Abb. 4-8). In dem *one dose mean graph* wird das prozentuale Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Wachstum 100 %) angegeben. Liegt das Zellwachstum nach Behandlung mit der Testsubstanz oberhalb von 100 %, so entspricht dies einer Wachstumsinduktion. Eine Wachstumshemmung wurde erreicht, wenn das Zellwachstum zwischen 0 % und 100 % liegt und ein Zellwachstum von unter 0 % bedeutet, dass die Zellen abgetötet wurden. Sofern eine signifikante Zellwachstums-Inhibition im *one-dose 60 cell line assay* beobachtet werden konnte, wurden die jeweiligen Verbindungen im *5-dose screen* an den 60 Zelllinien weiter untersucht, und zwar in den Konzentrationen 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} M. Das Zellwachstum wurde nach 48 stündiger Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz bestimmt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen fixiert, gewaschen und anschließend mit dem Farbstoff Sulforhodamin B behandelt, der an basische Aminosäurereste bindet. Die Zellmasse kann so durch Vermessung der angefärbten, solubilisierten Rückstände in den Kavitäten der Mikrotiterplatten spektralphotometrisch bestimmt werden. Aus der Zellmasse wurde schließlich das prozentuale Zellwachstum errechnet.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven, die für jede der 60 Zelllinien ermittelt wurden, konnten die GI_{50} -Werte (*growth inhibition 50 %*), die TGI-Werte (*total growth inhibition*) sowie die LC_{50} -Werte (*lethal concentration 50 %*) der Testsubstanzen abgeleitet werden. Alle Werte bezeichnen molare Substanzkonzentrationen. Für jeden dieser 3 Parameter wurde als Mittelwert der dekadischen Logarithmen der Einzelwerte der *meangraph midpoint* (MG-MID) errechnet. Er beschreibt die durchschnittliche antiproliferative Aktivität einer Verbindung gegenüber allen 60 Tumorzelllinien.

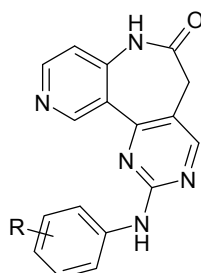
Die graphische Darstellung der GI_{50} -, TGI- und LC_{50} -Werte erfolgte für jede Testsubstanz in Form eines Balkendiagramms, dem sog. *mean graph*. Der *meangraph midpoint* bildet dabei eine senkrechte Achse. Zeigt eine Zelllinie einen Balken, der vom MG-MID nach links zeigt, so wird sie schwächer inhibiert als der Mittelwert. Ein nach rechts deutender Balken beschreibt eine stärkere Inhibition. Abbildung 4-9, Kapitel 4.3.3, stellt einen *meangraph* dar.

Tabelle 7-17: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **12b**, **12d**, **13b**, **13d** sowie **14d** (Zellwachstum [%]), n.v.: Wert nicht verfügbar



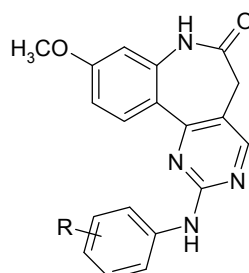
12b R = 3'-OH

12d R = 4'-OC₂H₅



13b R = 3'-OH

13d R = 4'-OC₂H₅



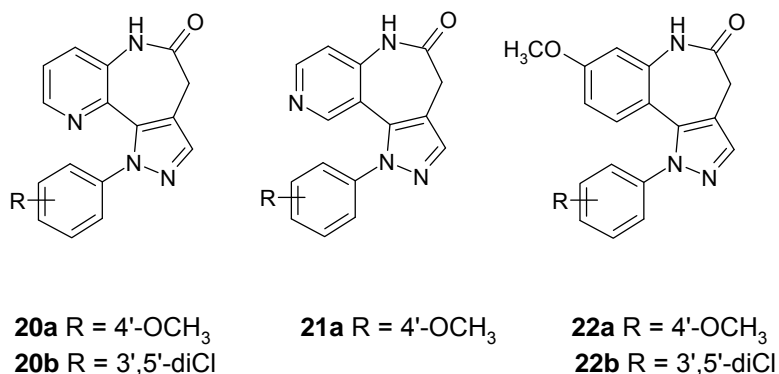
14d R = 4'-OC₂H₅

| Zelllinie | 12b | 12d | 13b | 13d | 14d |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|---------------|
| NSCLC | | | | | |
| A549/ATCC | 116.49 | 95.58 | 95.08 | 93.94 | 62.41 |
| EKVX | 118.08 | 104.02 | 93.23 | 80.48 | 69.14 |
| HOP-62 | 107.29 | 98.09 | 61.65 | 42.58 | 27.50 |
| HOP-92 | 87.85 | 116.59 | 61.44 | 41.75 | 25.35 |
| NCI-H226 | 91.34 | 107.87 | 79.41 | 31.84 | 42.10 |
| NCI-H23 | 108.15 | 101.01 | 81.16 | 85.46 | 47.24 |
| NCI-H322M | 103.46 | 85.57 | 6.81 | 49.25 | 78.69 |
| NCI-H460 | 100.27 | 115.52 | 75.89 | 60.95 | 47.18 |
| NCI-H522 | 120.82 | 87.21 | 67.31 | 50.57 | -22.56 |
| Darmkrebs | | | | | |
| COLO 205 | 117.63 | 124.62 | 105.35 | 71.60 | 82.80 |
| HCC-2998 | 106.87 | n.v. | 79.90 | 78.72 | n.v. |
| HCT-116 | 106.95 | 102.25 | 60.10 | 43.85 | 26.75 |
| HCT-15 | 90.73 | 93.84 | 60.45 | 43.81 | 55.48 |
| HT29 | 102.57 | 102.15 | 106.80 | 86.25 | 42.57 |
| KM12 | 99.91 | 113.86 | 65.48 | 40.75 | 11.30 |
| SW-620 | 104.58 | 101.21 | 61.55 | 56.60 | 56.94 |
| Brustkrebs | | | | | |
| BT-549 | 109.73 | 116.96 | 32.26 | 51.01 | -2.23 |
| HS 578T | 96.38 | 101.52 | 75.07 | 80.15 | 24.58 |
| MCF7 | 94.08 | 92.56 | 79.19 | 63.43 | 16.69 |
| MDA-MB-231/ATCC | 104.49 | 123.70 | 74.09 | 65.98 | 50.76 |
| MDA-MB-468 | 114.89 | 109.00 | 66.33 | 54.66 | -1.87 |
| T-47D | 89.43 | 106.28 | 60.60 | 58.46 | 85.30 |
| Prostatakrebs | | | | | |
| DU-145 | 113.24 | 112.85 | 71.57 | 88.05 | 58.63 |
| PC-3 | 76.15 | 49.53 | 68.82 | 74.01 | 53.21 |

Tabelle 7-17: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **12b**, **12d**, **13b**, **13d** sowie **14d** (Zellwachstum [%]), n.v.: Wert nicht verfügbar (Fortsetzung)

| Zelllinie | 12b | 12d | 13b | 13d | 14d |
|-------------------------------|--------|--------|---------------|--------|---------------|
| Ovarial-Krebs | | | | | |
| IGROV1 | 124.66 | 78.71 | 58.42 | n.v. | -38.31 |
| OVCAR-3 | 108.32 | 114.96 | 69.75 | 96.56 | 74.73 |
| OVCAR-4 | 102.03 | 104.39 | 45.72 | 45.84 | 52.85 |
| OVCAR-5 | 108.90 | 97.06 | 96.12 | 79.68 | 61.13 |
| OVCAR-8 | 123.70 | 93.22 | 84.43 | 83.08 | 34.25 |
| SK-OV-3 | 101.65 | 111.03 | 28.4 | 12.57 | 35.7 |
| NCI/ADR-RES | 105.27 | 116.49 | 105.44 | 95.22 | 24.76 |
| Leukämie | | | | | |
| CCRF-CEM | 81.37 | 103.99 | 76.98 | 73.75 | 42.61 |
| HL-60(TB) | 111.27 | 128.87 | 71.01 | 81.33 | 83.09 |
| K-562 | 131.07 | 103.92 | 89.51 | 84.07 | 9.86 |
| MOLT-4 | 145.36 | 96.88 | 86.66 | 82.21 | 17.92 |
| RPMI-8226 | 97.48 | 120.54 | 82.49 | 25.90 | 52.01 |
| SR | 241.70 | 93.20 | 98.97 | 87.56 | -5.30 |
| Nierenkrebs | | | | | |
| 786-0 | 110.16 | 99.40 | 80.59 | 53.48 | 42.63 |
| A498 | 97.53 | 122.21 | 71.90 | 29.02 | -3.79 |
| ACHN | 92.09 | 104.27 | 48.79 | 32.71 | 38.02 |
| CAKI-1 | 70.33 | 106.71 | -15.84 | 2.12 | 41.12 |
| RXF 393 | 120.12 | 108.04 | 74.42 | 60.47 | 13.84 |
| SN12C | 94.37 | 100.53 | 76.88 | 69.13 | 59.20 |
| TK-10 | 123.86 | 92.80 | 78.31 | 71.97 | 45.22 |
| UO-31 | 100.34 | 95.39 | 46.79 | 21.85 | 22.68 |
| Melanom | | | | | |
| LOX IMVI | 92.11 | 108.72 | 39.70 | 39.81 | 46.05 |
| M14 | 106.55 | 99.93 | 67.83 | 61.23 | 59.08 |
| MALME-3M | 106.33 | 164.02 | 67.88 | 77.60 | 6.89 |
| SK-MEL-2 | 119.77 | 102.70 | 79.03 | 41.03 | 30.00 |
| SK-MEL-28 | 108.98 | 122.49 | 91.83 | 92.18 | 60.07 |
| SK-MEL-5 | 97.36 | 102.72 | 76.57 | 73.54 | 65.60 |
| UACC-257 | 119.45 | 101.78 | 102.83 | 100.11 | 66.87 |
| UACC-62 | 88.74 | 107.14 | 53.97 | 42.12 | 51.32 |
| MDA-MB-435 | 105.08 | 98.89 | 73.40 | 70.94 | -0.93 |
| ZNS-Krebs | | | | | |
| SF-268 | 97.42 | 102.66 | 89.16 | 99.87 | 40.29 |
| SF-295 | 120.64 | 85.01 | 88.85 | 80.30 | 4.70 |
| SF-539 | 92.61 | 112.13 | 50.10 | 39.32 | 22.73 |
| SNB-19 | 101.94 | 110.62 | 84.65 | 84.02 | 35.60 |
| SNB-75 | 108.91 | 86.44 | 64.19 | 59.56 | 8.23 |
| U251 | 91.97 | 95.66 | 63.53 | 63.08 | 41.55 |
| Mittleres Zellwachstum | 107.18 | 104.33 | 70.65 | 62.84 | 36.95 |

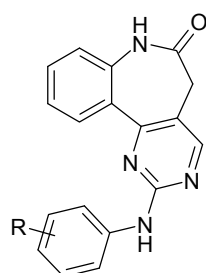
Tabelle 7-18: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **20a-b**, **21a** sowie **22a-b**
(Zellwachstum [%]), n.v.: Wert nicht verfügbar



| Zelllinie | 20a | 20b | 21a | 22a | 22b |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| NSCLC | | | | | |
| A549/ATCC | 76.70 | 98.71 | 124.89 | 74.24 | 30.78 |
| EKVX | 103.32 | 108.70 | 97.54 | 76.12 | 26.69 |
| HOP-62 | 91.88 | 95.50 | 88.29 | 93.55 | 71.53 |
| HOP-92 | 67.43 | 68.47 | 71.26 | 61.36 | 59.01 |
| NCI-H226 | 100.39 | 97.88 | 88.97 | 105.50 | 1.50 |
| NCI-H23 | 97.76 | 103.36 | 119.63 | 82.85 | 45.98 |
| NCI-H322M | 102.36 | 110.04 | 101.71 | 107.53 | 48.16 |
| NCI-H460 | 89.67 | 94.35 | 102.69 | 72.37 | -6.66 |
| NCI-H522 | 79.73 | 127.66 | 103.16 | 92.04 | 7.91 |
| Darmkrebs | | | | | |
| COLO 205 | 72.49 | 113.35 | 110.47 | 99.19 | 11.42 |
| HCC-2998 | 91.49 | 121.77 | 106.13 | 71.11 | 33.77 |
| HCT-116 | 89.78 | 91.49 | 91.84 | 81.61 | 18.38 |
| HCT-15 | 64.84 | 82.26 | 101.47 | 51.89 | 9.33 |
| HT29 | 66.46 | 98.89 | 97.09 | 72.52 | 16.11 |
| KM12 | 48.36 | 73.57 | 101.59 | 54.03 | -13.66 |
| SW-620 | 64.52 | 73.54 | 101.35 | 47.35 | 28.13 |
| Brustkrebs | | | | | |
| BT-549 | 105.00 | 86.34 | 103.31 | 61.90 | -7.35 |
| HS 578T | 93.66 | 88.10 | 113.67 | 63.68 | 23.69 |
| MCF7 | 67.68 | 72.18 | 88.45 | 43.76 | 8.21 |
| MDA-MB-231/ATCC | 93.05 | 97.85 | 96.07 | 71.44 | 27.05 |
| MDA-MB-468 | 85.52 | 61.87 | 91.92 | 69.47 | 30.05 |
| T-47D | 92.60 | 98.06 | 82.55 | 78.18 | 83.06 |
| Prostatakrebs | | | | | |
| DU-145 | 101.65 | 105.59 | 106.12 | 98.29 | -11.90 |
| PC-3 | 57.53 | 59.22 | 75.52 | 82.63 | 29.39 |

Tabelle 7-18: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **20a-b**, **21a** sowie **22a-b**
(Zellwachstum [%]), n.v.: Wert nicht verfügbar (Fortsetzung)

| Zelllinie | 20a | 20b | 21a | 22a | 22b |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| Ovarial-Krebs | | | | | |
| IGROV1 | 135.39 | 90.27 | 117.05 | 76.16 | 1.69 |
| OVCAR-3 | 83.61 | 86.20 | 102.01 | 86.44 | -48.65 |
| OVCAR-4 | 90.63 | 95.93 | 96.17 | 95.17 | 64.25 |
| OVCAR-5 | 111.32 | 105.61 | 111.57 | 92.58 | 43.52 |
| OVCAR-8 | 99.42 | 100.06 | 134.73 | 93.21 | 32.20 |
| SK-OV-3 | 86.18 | 90.27 | 107.01 | 98.69 | 51.73 |
| NCI/ADR-RES | 75.50 | 95.29 | 112.05 | 61.12 | 17.29 |
| Leukämie | | | | | |
| CCRF-CEM | 85.30 | 70.12 | 56.76 | 51.79 | 11.77 |
| HL-60(TB) | 96.04 | 60.80 | 86.15 | 37.99 | -6.50 |
| K-562 | 97.47 | 72.58 | 102.49 | 20.39 | 12.95 |
| MOLT-4 | 106.08 | 91.86 | 97.22 | 66.53 | 20.09 |
| RPMI-8226 | 53.72 | 74.07 | 105.18 | 60.89 | -9.94 |
| SR | 122.49 | 55.40 | 119.62 | 36.19 | 35.40 |
| Nierenkrebs | | | | | |
| 786-0 | 103.42 | 104.76 | 95.15 | 82.65 | 31.60 |
| A498 | 88.26 | 93.32 | 102.47 | 73.10 | 35.09 |
| ACHN | 96.15 | 97.50 | 103.93 | 98.16 | 32.56 |
| CAKI-1 | 63.72 | 101.28 | 68.11 | 65.72 | -13.68 |
| RXF 393 | 100.58 | 95.26 | 145.36 | 78.70 | 33.18 |
| SN12C | 96.42 | 99.15 | 89.59 | 95.17 | 43.02 |
| TK-10 | 109.20 | 109.26 | 120.99 | 102.84 | 107.71 |
| UO-31 | 100.67 | 95.93 | 90.29 | 76.58 | 20.86 |
| Melanom | | | | | |
| LOX IMVI | 80.26 | 81.46 | 90.26 | 62.62 | 23.68 |
| M14 | 84.45 | 82.29 | 97.20 | 49.36 | 29.62 |
| MALME-3M | 115.62 | 129.27 | 115.58 | 83.95 | 108.98 |
| SK-MEL-2 | 119.71 | 120.89 | 109.04 | 86.44 | 63.89 |
| SK-MEL-28 | 112.94 | 89.45 | 106.95 | 69.84 | 62.50 |
| SK-MEL-5 | 81.48 | 89.13 | 94.60 | 78.54 | -25.34 |
| UACC-257 | 102.26 | 92.33 | 124.62 | 75.84 | 76.23 |
| UACC-62 | 74.41 | 75.50 | 86.13 | 43.09 | 30.82 |
| MDA-MB-435 | 15.96 | 18.53 | 101.81 | 2.25 | -9.71 |
| ZNS-Krebs | | | | | |
| SF-268 | 86.19 | 96.60 | 94.62 | 90.23 | 2.75 |
| SF-295 | 92.66 | 112.82 | 117.36 | 96.61 | 14.20 |
| SF-539 | 85.79 | 71.53 | 94.94 | 69.82 | -20.80 |
| SNB-19 | 89.60 | 90.51 | 99.33 | 78.15 | 54.84 |
| SNB-75 | 93.24 | 98.89 | 90.19 | 65.15 | 71.48 |
| U251 | 85.16 | 81.06 | 92.05 | 69.02 | 21.52 |
| Mittleres Zellwachstum | 88.75 | 90.73 | 100.74 | 73.06 | 26.52 |

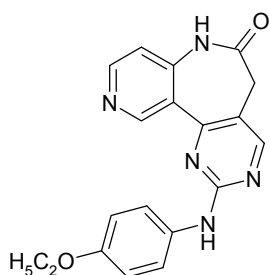
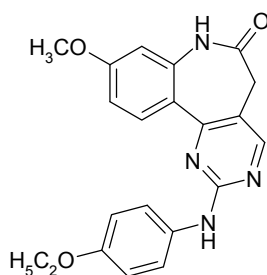
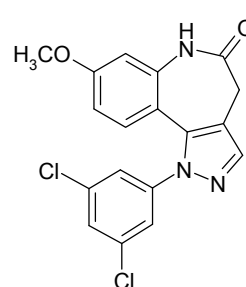
Tabelle 7-19: \log_{10} GI₅₀-Werte [M] für **10a-c** sowie **10e-f**^{a,b}^aErgebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.^bn.v.: Wert nicht verfügbar**10a-c, e-f**

- a:** R = 4'-OH
b: R = 3'-OH
c: R = 4'-OCH₃
e: R = 3'-Cl, 4'-OH
f: R = 3'-OH, 4'-OCH₃

| Zelllinie | 10a | 10b | 10c | 10e | 10f |
|------------------|---------------|-------------|---------------|-------|-------------|
| Leukämie | | | | | |
| CCRF-CEM | -5.20/> -4.00 | -5.53/-5.18 | -6.52/-4.75 | -5.53 | -6.24/-5.90 |
| HL-60(TB) | -5.51/> -4.00 | -5.66/-5.16 | -6.25/-4.55 | -5.94 | -6.57/-6.31 |
| K-562 | -5.66/> -4.00 | -5.69/-5.38 | -6.28/-5.35 | -5.71 | -6.51/-6.29 |
| MOLT-4 | -5.28/> -4.00 | -5.32/-5.20 | -5.47/> -4.00 | -5.50 | -5.57/-5.34 |
| RPMI-8226 | -4.65/> -4.00 | -4.89/-4.90 | -5.88/-5.26 | -4.97 | -5.64/-6.07 |
| SR | -5.66/> -4.00 | -6.31/-5.58 | -6.76/-5.52 | -6.28 | -6.65/6.66 |
| NSCLC | | | | | |
| A549/ATCC | je > -4.00 | -4.80/-4.74 | -5.07/-4.26 | -4.99 | -5.39/-5.09 |
| EKVX | -4.87/-4.44 | -5.02/-4.54 | -4.95/-4.70 | -4.90 | -5.35/-4.78 |
| HOP-62 | -5.12/-4.77 | -5.51/-5.46 | -5.86/-5.33 | -5.21 | -6.10/-5.74 |
| HOP-92 | -5.93/-4.84 | -6.08/-5.95 | -6.28/-5.78 | -6.11 | -6.44/-7.10 |
| NCI-H226 | -6.14/-4.45 | -5.15/-5.36 | -5.69/-6.08 | -5.04 | -5.79/-5.72 |
| NCI-H23 | -4.95/> -4.00 | -5.17/-4.90 | -5.66/-4.47 | -5.19 | -5.83/-5.47 |
| NCI-H322M | > -4.00/-4.68 | -4.33/-4.47 | > -4.00/-4.93 | -4.74 | -4.47/-4.69 |
| NCI-H460 | > -4.00/ n.v. | -4.77/-4.67 | -5.62/-4.51 | -4.70 | -5.70/-5.69 |
| NCI-H522 | -5.11/n.v. | -5.25/n.v. | -4.85/n.v. | n.v. | -6.34/n.v. |
| Darmkrebs | | | | | |
| COLO 205 | je > -4.00 | -4.64/-4.50 | -5.45/> -4.00 | -4.90 | -5.74/-5.13 |
| HCC-2998 | > -4.00/-4.05 | -4.64/-4.49 | -4.83/-4.81 | -4.68 | -5.09/-5.86 |
| HCT-116 | -4.91/> -4.00 | -5.31/-4.96 | n.v./-5.52 | -4.86 | -6.40/-6.34 |
| HCT-15 | -5.50/> -4.00 | n.v./-4.69 | n.v./-4.43 | n.v. | n.v./n.v. |
| HT29 | -5.14/> -4.00 | -4.49/-4.49 | -5.46/-4.69 | -4.64 | -5.51/-5.44 |
| KM12 | -5.58/> -4.00 | -5.70/-5.48 | -6.43/-5.86 | -5.60 | -6.57/-6.44 |
| SW-620 | -5.19/> -4.00 | -4.98/-4.97 | -6.25/-5.20 | -4.98 | -6.44/-6.28 |
| ZNS-Krebs | | | | | |
| SF-268 | -4.82/n.v. | -4.98/-5.27 | -5.22/-5.16 | -4.97 | -5.30/-5.74 |
| SF-295 | -4.98/-4.90 | -4.72/-5.44 | -5.21/-5.43 | -4.74 | -5.63/-5.67 |
| SF-539 | -5.83/-4.20 | -6.19/-5.66 | -6.38/-5.52 | -6.10 | -6.50/-6.06 |
| SNB-19 | -4.24/-4.19 | -4.58/-4.26 | -4.62/-4.74 | -4.80 | -4.86/-4.56 |
| SNB-75 | -5.77/-4.82 | -5.60/-5.24 | -5.79/-5.41 | -5.56 | -6.07/-5.74 |
| U251 | -4.95/-4.81 | -4.70/-4.63 | -4.83/-4.91 | -4.90 | -4.85/-4.83 |

Tabelle 7-19: \log_{10} GI₅₀-Werte [M] für **10a-c** sowie **10e-f** (Fortsetzung)^{a,b}^aErgebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.^bn.v.: Wert nicht verfügbar

| Zelllinie | 10a | 10b | 10c | 10e | 10f |
|----------------------|---------------|-------------|---------------|--------|-------------|
| Melanom | | | | | |
| LOX IMVI | -5.42/-4.33 | -5.90/-5.37 | -6.24/-5.31 | -5.72 | -6.30/-6.31 |
| MALME-3M | -4.59/> -4.00 | -4.69/-4.68 | -4.79/-4.80 | n.v. | -6.10/-4.68 |
| M14 | n.v./> -4.00 | n.v./-4.94 | n.v./> -4.00 | n.v. | n.v./-6.30 |
| SK-MEL-2 | n.v./-4.41 | n.v./-5.46 | n.v./-6.06 | n.v. | n.v./-6.63 |
| SK-MEL-28 | je > -4.00 | -4.33/-4.38 | > -4.00/n.v. | >-4.00 | -4.36/-4.49 |
| SK-MEL-5 | -5.22/> -4.00 | -5.38/-4.74 | -6.36/-4.52 | -4.91 | -6.25/-4.87 |
| UACC-257 | je > -4.00 | -4.51/-4.64 | -4.18/-4.25 | -4.41 | -4.73/-4.71 |
| UACC-62 | -5.00/> -4.00 | -4.79/-5.08 | -5.75/-5.30 | -4.59 | -6.24/-6.31 |
| MDA-MB-435 | -5.44/> -4.00 | -4.99/-5.35 | n.v./-5.50 | -5.54 | -6.71/-6.70 |
| Ovarial-Krebs | | | | | |
| IGROV1 | -6.25/-5.26 | -6.54/-6.34 | -6.35/-6.43 | n.v. | -6.35/-7.35 |
| OVCAR-3 | > -4.00/-4.80 | -4.37/-4.67 | -4.85/-4.47 | -4.77 | -5.99/-7.14 |
| OVCAR-4 | -6.07/-4.14 | -5.03/-5.05 | n.v./-5.79 | -4.94 | -6.34/n.v. |
| OVCAR-5 | -4.31/> -4.00 | -4.84/-4.86 | -5.17/> -4.00 | -4.78 | -5.31/-4.80 |
| OVCAR-8 | je > -4.00 | -4.49/-4.53 | -5.04/-4.59 | -4.69 | -5.27/-4.88 |
| SK-OV-3 | -5.59/-4.23 | -5.18/-4.98 | n.v./-5.63 | n.v. | -6.56/n.v. |
| NCI/ADR-RES | -4.70/> -4.00 | -4.65/-4.44 | -5.51/> -4.00 | -4.74 | -5.44/-5.46 |
| Nierenkrebs | | | | | |
| 786-0 | -4.34/-4.50 | -5.23/-5.17 | -5.63/-5.25 | -4.78 | -5.88/-5.79 |
| A498 | -6.02/-4.82 | -5.30/-5.36 | -5.77/-6.42 | -4.88 | -5.87/-5.62 |
| ACHN | -6.17/-4.48 | -6.27/-5.58 | -6.58/-5.85 | -6.49 | -6.84/-6.67 |
| RXF 393 | -6.17/-4.93 | -6.25/-5.65 | -6.48/-6.17 | -6.54 | -6.88/-7.05 |
| CAKI-1 | -6.34/-5.33 | -6.06/-6.21 | -6.34/-6.25 | -5.33 | -6.67/-7.02 |
| SN12C | -4.78/> -4.00 | -4.71/-4.83 | -5.27/-4.70 | -4.80 | -5.48/-5.24 |
| TK-10 | -5.48/-4.65 | -4.96/-5.02 | -5.10/-6.32 | -4.94 | -5.66/-5.22 |
| UO-31 | -5.63/-4.67 | -6.01/-6.05 | -6.04/-5.96 | n.v. | -6.16/-6.87 |
| Prostatakrebs | | | | | |
| PC-3 | je > -4.00 | -4.76/-4.69 | -5.34/-4.04 | -4.75 | -5.51/-4.85 |
| DU-145 | -4.84/-4.87 | -4.85/-4.80 | n.v./-5.14 | -4.85 | -6.13/-4.94 |
| Brustkrebs | | | | | |
| MCF7 | -5.10/n.v. | -5.32/-5.28 | -5.43/-5.13 | -5.22 | -6.13/-6.08 |
| MDA-MB231/ ATCC | -4.93/-4.80 | -4.85/-4.75 | -4.81/-5.00 | -4.92 | -5.49/-4.72 |
| HS 578T | -5.95/-4.76 | -5.86/-5.53 | -6.63/-5.37 | -6.14 | -6.52/-6.08 |
| BT-549 | -5.90/-4.66 | -6.21/-4.86 | -6.41/-5.07 | -6.04 | -6.45/-6.34 |
| T-47D | n.v./> -4.00 | n.v./-4.52 | n.v./-5.05 | n.v. | n.v./-5.18 |
| MDA-MB-468 | n.v./n.v. | n.v./n.v. | n.v./n.v. | n.v. | n.v./n.v. |
| MG-MID | -5.09/-4.33 | -5.21/-5.06 | -5.59/-5.11 | -5.17 | -5.91/-5.77 |

Tabelle 7-20: \log_{10} GI₅₀-Werte [M] für **13d**, **14d** sowie **22b**^a^an.v.: Wert nicht verfügbar**13d****14d****22b**

| Zelllinie | 13d | 14d | 22b |
|------------------|---------|---------|---------|
| Leukämie | | | |
| CCRF-CEM | > -4.00 | n.v. | > -4.00 |
| HL-60(TB) | > -4.00 | -6.17 | -7.28 |
| K-562 | n.v. | n.v. | -7.29 |
| MOLT-4 | n.v. | n.v. | -6.54 |
| RPMI-8226 | -6.62 | -6.12 | -6.16 |
| SR | > -4.00 | n.v. | -7.34 |
| NSCLC | | | |
| A549/ATCC | > -4.00 | -5.62 | -6.53 |
| EKVX | -4.48 | > -4.00 | -6.15 |
| HOP-62 | -5.41 | -5.43 | -6.42 |
| HOP-92 | -5.47 | -6.51 | -5.09 |
| NCI-H226 | -5.61 | -6.23 | -5.96 |
| NCI-H23 | -4.84 | -5.30 | -6.23 |
| NCI-H322M | -5.86 | -4.54 | -6.12 |
| NCI-H460 | -4.13 | -5.76 | -6.81 |
| NCI-H522 | -5.24 | -4.85 | -7.39 |
| Darmkrebs | | | |
| COLO 205 | > -4.00 | -5.21 | -6.84 |
| HCC-2998 | > -4.00 | -5.54 | -6.84 |
| HCT-116 | -5.47 | -5.70 | -6.99 |
| HCT-15 | -5.26 | -6.05 | -7.18 |
| HT29 | > -4.00 | -5.32 | -7.25 |
| KM12 | -5.47 | -6.40 | -7.22 |
| SW-620 | -5.24 | -5.43 | -7.38 |
| ZNS-Krebs | | | |
| SF-268 | -4.79 | -5.69 | -6.71 |
| SF-295 | -4.43 | -5.60 | -7.28 |
| SF-539 | -5.50 | -6.33 | -6.99 |
| SNB-19 | > -4.00 | -5.52 | -6.90 |
| SNB-75 | -5.86 | -6.34 | -7.21 |
| U251 | -4.98 | -5.68 | -6.90 |

Tabelle 7-20: \log_{10} GI₅₀-Werte [M] für **13d**, **14d** sowie **22b** (Fortsetzung)^a^an.v.: Wert nicht verfügbar

| Zelllinie | 13d | 14d | 22b |
|----------------------|------------|------------|------------|
| Melanom | | | |
| LOX IMVI | -5.57 | -5.58 | -6.51 |
| MALME-3M | -5.31 | -5.29 | -4.98 |
| M14 | -5.59 | -4.62 | -7.08 |
| SK-MEL-2 | -5.37 | -5.76 | -5.90 |
| SK-MEL-28 | -4.01 | -5.12 | n.v. |
| SK-MEL-5 | > -4.00 | -5.69 | -7.44 |
| UACC-257 | > -4.00 | -4.99 | -4.87 |
| UACC-62 | -5.51 | -6.01 | -7.35 |
| MDA-MB-435 | > -4.00 | -6.05 | -7.61 |
| Ovarial-Krebs | | | |
| IGROV1 | -6.38 | n.v. | -6.52 |
| OVCAR-3 | -4.53 | -5.48 | -7.36 |
| OVCAR-4 | -5.93 | -6.19 | -6.40 |
| OVCAR-5 | n.v. | -5.15 | -5.94 |
| OVCAR-8 | -4.66 | -5.43 | -6.57 |
| SK-OV-3 | -5.92 | -6.44 | -6.81 |
| NCI/ADR-RES | > -4.00 | -5.35 | -7.11 |
| Nierenkrebs | | | |
| 786-0 | -4.74 | -5.47 | -6.33 |
| A498 | -6.28 | -6.43 | -7.32 |
| ACHN | -5.94 | -6.21 | -6.79 |
| RXF 393 | -6.17 | n.v. | -7.45 |
| CAKI-1 | n.v. | -6.72 | -7.09 |
| SN12C | -5.40 | -5.22 | -6.24 |
| TK-10 | -4.47 | -5.64 | -6.16 |
| UO-31 | -6.28 | -6.29 | -6.39 |
| Prostatakrebs | | | |
| PC-3 | > -4.00 | -5.62 | n.v. |
| DU-145 | -5.42 | -5.77 | -6.56 |
| Brustkrebs | | | |
| MCF7 | > -4.00 | -5.73 | -7.42 |
| MDA-MB231/ATCC | -5.23 | -5.57 | -6.58 |
| HS 578T | -5.63 | -5.89 | -7.53 |
| BT-549 | -5.57 | -5.62 | -6.53 |
| T-47D | > -4.00 | -5.77 | -6.13 |
| MDA-MB-468 | -5.55 | -4.41 | -7.56 |
| MG-MID | -5.0 | -5.65 | -6.68 |

7.3.3 Durchführung der molekularen Docking-Studien

Das molekulare Docking wurde von Jan Dreher, Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, durchgeführt. Die Dockingstudien erfolgten mit Schrödinger's GLIDE, Version 5.0, Schrödinger, L.L.C.: New York, NY, 2008. GLIDE steht für *Grid-based Ligand Docking with Energetics*. Die verwendeten Energiefunktionen sind *all atoms force field*, d.h. alle Atome wurden mit einbezogen, inklusive den in der Kristallstruktur nicht enthaltenen Wasserstoffatomen. Berücksichtigt werden u. a. Energiebeiträge für Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Beiträge (Coulomb-Wechselwirkungen, van der Waals-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen mit Metallionen), lipophile Wechselwirkungen sowie entropische Beiträge für frei drehbare Bindungen.

Für das Docking wurde die VEGF-R2-Röntgenkristallstruktur 1YWN aus der Proteindatenbank (PDB) gewählt.¹² In dieser Röntgenkristallstruktur liegt VEGF-R2 in der aktiven Konformation vor.

Als Vorbereitung der Kristallstruktur für das Docking wurden alle Wassermoleküle entfernt. Mit Hilfe des Protein Preparation Wizard von Maestro (Maestro, version 8.5, Schrödinger, L.L.C.: New York, NY, 2008) wurden formale Ladungen gesetzt und fehlende Atome der Seitenkette sowie Wasserstoffatome zu den Aminosäureresten hinzugefügt, da GLIDE nur mit einem expliziten Modell rechnen kann. Für das Docking wurde der Extraprecision-Algorithmus (XP) von GLIDE mit den voreingestellten Parametern verwendet.¹⁶¹ Die Visualisierung der Dockingresultate erfolgte mit VIDA, Version 3.0.0, OpenEye Scientific Software, Inc.: Santa Fe, NM, 2007.

8 Literaturverzeichnis

1. Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il farmaco* **2004**, 59, 759-765.
2. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
3. Cohen, P.: Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 309-315.
4. Kunick, C., Egert-Schmidt, A.-M.: Die kurze Geschichte der Proteinkinase-Inhibitoren. *Pharm. Unserer Zeit* **2008**, 5, 360-368.
5. Hanks, S. K., Hunter, T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, 9, 576-596.
6. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., K., R., Watson, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl., **1995**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 897-899.
7. Sachsenmaier, C.: Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* **2001**, 24, 346-355.
8. Blume-Jensen, P., Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, 411, 355-365.
9. Hunter, T.: The croonian lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: Its role in cell growth and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1998**, 353, 583-605.
10. Noble, M. E. M., Endicott, J. A., Johnson, L. N.: Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure. *Science* **2004**, 303, 1800-1805.
11. Liao, J. J.: Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 409-424.
12. Miyazaki, Y., Matsunaga, S., Tang, J., Maeda, Y., Nakano, M., Philippe, R. J., Shibahara, M., Liu, W., H., S., Wang, L., Nolte, R. T.: Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2203-2207.
13. Melnikova, I., Golden, J.: Targeting protein kinases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 993-994.
14. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., K., R., Watson, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl., **1995**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1439-1442.

15. Neye, H.: Monoklonale Antikörper: Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel. *Pharm. Ztg.* **2006**, 151, 3960-3970.
16. Schöffski, P., Dumez, H., Clement, P., Hoeben, A., Prenen, H., Wolter, P., Joniau, S., Roskams, T., Van Poppel, H.: Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. *Ann. Oncol.* **2006**, 17, 1185-1196.
17. Geier, C., Posch, M. G., Dietz, R., Garratt, A. N., Özcelik, C.: Molekulare Mechanismen der Kardiotoxizität von Tyrosinkinaseinhibitoren. *Kardiologe* **2007**, 3, 209-215.
18. Wick-Urban, B.: Darmkrebs: Panitumumab versus Cetuximab. *Pharm. Ztg.* **2007**, 152, 830-831.
19. Peeters, M., Balfour, J., Arnold, D.: Panitumumab - a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, 28, 269-281.
20. Fieth, C., Kebabian, A., Mohr, K.: Angiogenese-Hemmung in der Krebstherapie: Bevacizumab gegen Dickdarmkarzinom. *Pharm. Unserer Zeit* **2007**, 6, 442-445.
21. Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., Rudge, J. S.: VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 11393-11398.
22. Malik, A. K., Gerber, H.-P.: Targeting VEGF ligands and receptors in cancer. *Targets.* **2003**, 2, 48-57.
23. Alves, H., Hiddemann, W.: Tyrosinkinaseinhibitoren - Ein Ansatz zur Pathogeneseorientierten Tumorthherapie. *Internist* **1997**, 38, 1074-1082.
24. Fabbro, D., Ruetz, S., Buchdunger, E., Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Liebetanz, J., Mestan, J., O'Reilly, T., Traxler, P., Chaudhuri, B., Fretz, H., Zimmermann, J., Meyer, T., Caravatti, G., Furet, P., Manley, P. W.: Protein kinases as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 93, 79-98.
25. Mealy, N. E., Lupone, B.: Drugs under development for the treatment of head and neck cancer. *Drugs Fut.* **2006**, 31, 625-639.
26. http://www.astrazeneca.de/az/content_p/005/162.jsp. 11.2008.
27. Stinchcombe, T. E., Socinski, M. A.: Gefitinib in advanced non-small cell lung cancer: Does it deserve a second chance? *Oncologist* **2008**, 13, 933-944.
28. Becker, C.: Brustkrebs: Lapatinib als neuer Hoffnungsträger. *Pharm. Ztg.* **2006**, 151, 2546-2547.

-
29. Hunter, T.: Treatment for chronic myelogenous leukemia: The long road to imatinib. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 2036-2043.
 30. Weisberg, E., Manley, P., Mestan, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, A., Griffin, J. D.: AMN107 (nilotinib): A novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br. J. Cancer* **2006**, 94, 1765-1769.
 31. Dalglish, A., Copier, J.: New multitargeted treatments with antiangiogenic and antitumor activity: Focus on sunitinib. *Targ. Oncol.* **2007**, 2, 17-29.
 32. Ji, Z., Ahmed, A. A., Albert, D. H., Bouska, J. J., Bousquet, P. F., Cunha, G. A., Glaser, K. B., Guo, J., Li, J., Marcotte, P. A., Moskey, M. D., Pease, L. J., Stewart, K. D., Yates, M., Davidson, S. K., Michaelides, M. R.: Isothiazolopyrimidines and isoxazolopyrimidines as novel multi-targeted inhibitors of receptor tyrosine kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4326-4330.
 33. Kalka, C., Ashara, T., Krone, W., Isner, J. M.: Angiogenese und Vaskulogenese. *Herz* **2000**, 25, 611-622.
 34. Donate, F.: Antiangiogenic therapy in cancer. *Drugs Fut.* **2005**, 30, 695-706.
 35. Hofner, A. F., Pfeifer, C.: Angiogenesehemmung: Neue Strategie in der Tumorthherapie. *Pharm. Ztg.* **2004**, 149, 2808-2813.
 36. Mousa, S. A., Ahmed, A. S.: Recent advances in antiangiogenesis strategies. *Drugs Fut.* **2005**, 30, 1047-1057.
 37. Ellis, L. M., Hicklin, D. J.: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumor activity. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 579-591.
 38. Garcia, J. A., Rini, B. I.: Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma. *CA Cancer J. Clin.* **2007**, 57, 112-125.
 39. Sridhar, S. S., Hedley, D., Siu, L. L.: Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, 4, 677-685.
 40. Pang, R. W. C., Poon, R. T. P.: From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: The future is now. *Oncology* **2007**, 72, 30-44.
 41. Dai, Y., Guo, Y., Frey, R. R., Ji, Z., Curtin, M. L., Ahmed, A. A., Albert, D. H., Arnold, L., Arries, S. S., Barlozzari, T., Bouska, J. J., Bousquet, P. F., Cunha, G. A., Glaser, K. B., Guo, J., Li, J., Marcotte, P. A., Marsh, K. C., Moskey, M. D., Pease, L. J., Stewart, K. D., Stoll, V. S., Tapang, P., Wishart, N., Davidson, S. K., Michaelides, M. R.: Thienopyrimidine ureas as novel and potent multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6066-6083.
 42. Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R. A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S.: Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 835-844.

43. McIntyre, J. A., Castaner, J.: Sunitinib Malate. *Drugs Fut.* **2005**, 30, 785-792.
44. Becker, C.: Krebstherapie: Sorafenib greift von zwei Seiten an. *Pharm. Ztg.* **2005**, 150, 3984-3985.
45. Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Aufl., **1994**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 60-67.
46. Bogoyevitch, M. A., Fairlie, D. P.: A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug Discov. Today* **2007**, 12, 622-633.
47. Egner, U., Krätzschar, J., Kreft, B., Pohlenz, H.-D., Schneider, M.: The target discovery process. *ChemBioChem* **2005**, 6, 468-479.
48. Gill, A., Cleasby, A., Jhoti, H.: The discovery of novel protein kinase inhibitors by using fragment-based high-throughput x-ray crystallography. *ChemBioChem* **2005**, 6, 506-512.
49. v. Ahsen, O., Bömer, U.: High-throughput screening for kinase inhibitors. *ChemBioChem* **2005**, 6, 481-490.
50. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3-25.
51. Keserü, G. M., Makara, G. M.: Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 741-748.
52. Bleicher, K. H., Böhm, H.-J., Müller, K., Alanine, A. I.: Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 369-378.
53. Davis, A. M., Teague, S. J., Kleywegt, G. J.: Anwendung und Grenzen kristallographischer Daten im strukturbezogenen Liganden- und Wirkstoff-Design. *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2822-2841.
54. Hodgson, J.: ADMET - turning chemicals into drugs. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 722-726.
55. Gribbon, P., Sewing, A.: High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 17-22.
56. Rishton, G. M.: Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 86-96.
57. Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D., Oprea, T.: Design kombinatorischer Leitstruktur-Bibliotheken. *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3962-3967.
58. Kunick, C.: Fused azepinones with antitumor activity. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, 5, 181-194.

-
59. Kunick, C., Zeng, Z., Gussio, R., Zaharevitz, D., Leost, M., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Meijer, L., Lemcke, T.: Structure-aided optimization of kinase inhibitors derived from alsterpaullone. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1-9.
60. Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis, evaluation of CDK1/Cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2909-2919.
61. Kohfeld, S.: Untersuchungen zur Synthese, biologischen Aktivität und Stabilität von Paullonen und verwandten *d*-anellierten [1]Benzazepinonen. Dissertation Technische Universität Braunschweig **2006**.
62. Andersen, C. B., Wan, Y., Chang, J. W., Riggs, B., Lee, C., Liu, Y., Sessa, F., Villa, F., Kwiatkowski, N., Suzuki, M., Nallan, L., Heald, R., Musacchio, A., Gray, N. S.: Discovery of selective aminothiazole aurora kinase inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 180-192.
63. Siebert, C. D.: Das Bioisosterie-Konzept. *Chem. Unserer Zeit* **2004**, 38, 320-324.
64. Kohfeld, S., Jones, P. G., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C.: 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-ones: A new class of antiproliferative agents with selectivity for human leukemia and breast cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 1317-1324.
65. Dunkel, U.: Die Sonogashira-Reaktion zur Synthese von alkinylierten 1-Benzazepin-2-onen. Darstellung und biologische Aktivität neuer Kinase-Inhibitoren - Dissertation Technische Universität Braunschweig **2007**.
66. Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxy-carbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.
67. Carpino, L. A., Xia, J., El-Faham, A.: 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzotriazene. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 54-61.
68. Taylor, E. C., Knopf, R. J., Cogliano, J. A., Barton, J. W., Pleiderer, W.: A facile pyrimidine ring cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 6058-6064.
69. Stukenbrock, H.: Design und Synthese neuartiger GSK-3-Inhibitoren: Wirkstoffe zur Protektion und Proliferationsstimulation pankreatischer β -Zellen. Dissertation Technische Universität Braunschweig **2008**.
70. Lauenroth, K.: Paullonderivate mit veränderter heterozyklischer Grundstruktur als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen. Dissertation Universität Hamburg **2001**.
71. Prühs, C.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Darponen. Dissertation Technische Universität Braunschweig **2007**.

72. Chen, W.-Y., Gilman, N. W.: Synthesis of 7-phenylpyrimido[5,4-d][1]benzazepin-2-ones (1). *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 663-666.
73. Tavares, F. X., Boucheron, J. A., Dickerson, S. H., Griffin, R. J., Preugschat, F., Thomson, S. A., Wang, T. Y., Zhou, H.-Q.: *N*-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-*b*]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4716-4730.
74. Berger, B. M.: Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen auf der Basis von 7-Acetyl-1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-1-benzazepin-2-on: Synthese und biologische Aktivität. Dissertation Technische Universität Braunschweig **2007**.
75. Moffat, D. F. C., Allen, R. A., Rapecki, S. E., Davis, P. D., O'Connell, J., Hutchings, M. C., King, M. A., Boyce, B. A., Perry, M. J.: 4-Thiophenoxy-*N*-(3,4,5-trialkoxyphenyl)-pyrimidine-2-amines as potent and selective inhibitors of the T-cell tyrosine kinase p56lck. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 747-753.
76. Möllenbeck, J. M.: Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen: Synthese und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Dissertation Universität Hamburg **2005**.
77. Chanda, B. M., Sulake, R. S.: An expeditious convergent synthesis of a dibromotyrosine alkaloid inhibitor of mycothiol-S-conjugate amidase. *Tetrahedron. Lett.* **2005**, 46, 6461-6463.
78. Wieking, K.: Strukturmodifikation und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen. Dissertation Universität Hamburg **2001**.
79. Ple, P. A., Green, T. P., Hennequin, L. F., Curwen, J., Fennel, M., Allen, J., Lambert-van der Brempt, C., Costello, G.: Discovery of a new class of anilinoquinazoline inhibitors with high affinity and specificity for the tyrosine kinase domain of c-Src. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 871-887.
80. Schenck, L. W., Kuna, K., Frank, W., Alberts, B., Asche, C., Kucklaender, U.: 1,4,9,10-Anthradiquinone as precursor for antitumor compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3599-3614.
81. Burckhalter, J. H., Tendick, F. H., Jones, E. M., Jones, P. A., F., H. W., Rawlins, A. L.: Aminoalkylphenols as antimalarials. II. (Heterocyclic-amino)- α -amino-*o*-cresols. The synthesis of camoquin. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 1363-1373.
82. Arend, M., Westermann, B., Risch, N.: Moderne Varianten der Mannich-Reaktion. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1096-1122.
83. Asche, C., Frank, W., Albert, A., Kucklaender, U.: Synthesis, antitumor activity and structure-activity relationships of 5*H*-benzo[*b*]carbazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 819-837.
84. Pochini, A., Puglia, G., Ungaro, R.: Selective synthesis of phenolic mannich bases under solid-liquid phase transfer conditions. *Synthesis* **1983**, 906-907.

-
85. Beyer, H., Walter, W.: *Lehrbuch der organischen Chemie*. 22. Aufl., **1991**, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 749.
86. Rueeger, H., Gerspacher, M., Buehlmayer, P., Rigollier, P., Yamaguchi, Y., Schmidlin, T., Whitebread, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Nick, H., Cricione, L.: Discovery and SAR of potent, orally available and brain-penetrable 5,6-dihydro-4*H*-3-thia-1-aza-benzo[*e*]azulen- and 4,5-dihydro-6-oxa-3-thia-1-aza-benzo[*e*]azulen derivatives as neuropeptide Y Y5 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2451-2457.
87. Becker, H. G. O., Beckert, R., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewalt, K., Gluch, R., Habicher, W. D., Mayer, R., Metz, P., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlick, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G.: *Organikum*. 22. Aufl., **2004**, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 612-614.
88. Meshram, H. M., Reddy, P. N., Sadashiv, K., Yadav, J. S.: Amberlyst-15[®]-promoted efficient 2-halogenation of 1,3-keto-esters and cyclic ketones using *N*-halosuccinimides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 623-626.
89. Rickards, R. W., Smith, R. M.: The synthesis of 1*H*, 2*H*, 5*H*-azepine-2,5-diones by Schmidt rearrangement of quinones. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 22, 2361-2365.
90. Rees, A. H.: Azatropolones. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3111-3116.
91. Göblyös, A., Santiago, S. N., Pietra, D., Mulder-Krieger, T., von Frijtag Drabbe Künzel, J., Brussee, J., IJzerman, A. P.: Synthesis and biological evaluation of 2-aminothiazoles and their amide derivatives on human adenosine receptors. Lack of effect of 2-aminothiazoles as allosteric enhancers. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2079-2087.
92. Padmavathi, V., Reddy, T. V. R., Reddy, K. A., Reddy, A. P., Reddy, D. B.: A study on the reactivity of 1,3-dimethyl-2,6-diphenyl-4-piperidone: Synthesis of some novel heterocycles. *Indian J. Chem.* **2005**, 44B, 2527-2531.
93. Schenone, P., Mosti, L., Menozzi, G.: Reaction of 2-dimethylaminomethylene-1,3-diones with dinucleophiles. I. Synthesis of 1,5-disubstituted 4-acylpyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, 19, 1355-1361.
94. Olivera, R., SanMartin, R., Dominguez, E.: A combination of tandem-exchange/heterocyclization and biaryl coupling reactions for the straightforward preparation of phenanthro[9,10-*d*]pyrazoles. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7010-7019.
95. Al-Saleh, B., Abdel-Khalik, M. M., Darwich, E., Salah, O. A.-M., Elnagdi, M. H.: Functionally substituted alkylbenzotriazoles: Reactivity of alkylbenzotriazoles towards electrophilic and nucleophilic reagents. *Heteroat. Chem.* **2002**, 13, 141-145.

96. Kira, M. A., Abdel-Rahman, M. O., Gadalla, K. Z.: The Vilsmeier-Haack reaction - III. Cyclization of hydrazones to pyrazoles. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2, 109-110.
97. Lebedev, A. V., Lebedeva, A. B., Sheludiyakov, V. D., Kovaleva, E. A., Ustinova, O. L., Kozhevnikov, I. B.: Vilsmeier formylation of hydrazones and semicarbazones derived from alkyl, benzyl, and cycloalkyl methyl ketones. *Russ. J. Gen. Chem.* **2005**, 75, 448-452.
98. Sivaprasad, G., Sridhar, R., Perumal, P.: Selective synthesis of some 4,5-dihydro-2*H*-benzo[*g*]indazoles and 8,9-dihydro-2*H*-benzo[*e*]indazoles via the Vilsmeier-Haack reaction under thermal and microwave assisted conditions. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, 43, 389-394.
99. Laue, T., Plagens, A.: *Namens- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*. 3. Aufl., **1998**, Teubner, Stuttgart, 313-315.
100. Sako, M.: Product Class 19: Pyridopyrimidines. In: *Science of synthesis*, category 2, volume 16: Six-membered heteroarenes with two identical heteroatoms. (Hrsg.: Y. Yamamoto), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2004**, 1155-1267.
101. Hamama, W. S., Ismail, M. A., Al-Saman, H. A., Zoorob, H. H.: Convenient selective synthesis of substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidones and annulated derivatives. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2006**, 62b, 104-110.
102. Robins, R. K., Hitchings, G. H.: Studies on condensed pyrimidine systems. XIX. A new synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. The condensation of 1,3-diketones and 3-ketoaldehydes with 4-aminopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3449-3457.
103. Quiroga, J., Insuasty, H., Abonia, R., Cobo, J., Sanchez, A., Nogueras, M.: New aspects on the selective synthesis of 7-arylpyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Tetrahedron* **2002**, 58, 4873-4877.
104. Bagley, M. C., Hughes, D. D., Lloyd, R., Powers, V. E. C.: A new and highly expedient synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6585-6588.
105. Troschütz, R., Anders, E.: Michael-Addition von 6-Aminopyrimidin-4-onen an Enone: Semi-empirische MO-Rechnungen sowie experimentelle Untersuchungen. *Arch. Pharm.* **1992**, 325, 341-348.
106. Azizian, J., Mohammadizadeh, M. R., Mohammadi, A. A., Karimi, A. R., Teimouri, F.: A novel one-pot procedure for preparation of some new condensed pyrido[2,3-*d*]pyrimidine(1*H*,3*H*)-2,4-diones. *Heteroat. Chem.* **2007**, 18, 16-18.
107. Maeba, I., Nishiyama, Y., Wakimura, M., Tabata, T.: Synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (5-deazapteridine) *C*-nucleosides from a glycosyl enaminone. *Carbohydr. Res.* **1996**, 290, 71-77.

108. Wood, H. C. S., Wigglesworth, R., Yeowell, D. A., Gurney, F. W., Hurlbert, B. S.: Specific enzyme inhibitors in vitamin biosynthesis. Part II. Revised structures for some 8-substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 1225-1230.
109. Shaaban, M. R., Saleh, T. S., Farag, A. M.: Synthesis and antimicrobial evaluation of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, triazolo[1,5-*a*]pyrimidine and pyrimido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives. *Heterocycles* **2007**, 71, 1765-1777.
110. Vasudevan, A., Mavandadi, F., Chen, L., Gangjee, A.: Reactions of 6-aminopyrimidines with biselectrophiles: Manipulation of product composition with solvent and pyrimidine substitution variation. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 634-638.
111. Schultz, C.: Antitumoraktive [*d*]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. Dissertation Universität Hamburg. **1999**, 82.
112. Ming, L., Shuwen, W., Lirong, W., Huazheng, Y., Xiuli, Z.: A convenient, rapid, and highly selective method for synthesis of new pyrazolo[1,5- α]pyrimidines via the reaction of enaminones and 5-amino-1*H*-pyrazoles under microwave irradiation. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, 42, 925-930.
113. Fischer, G.: Recent progress in 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine chemistry. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2008**, 95, 143-219.
114. Hassaneen, H. M., Abdallah, T. A., Abdelhadi, H. A., Hassaneen, H. M. E., Pagni, R. M.: Polyfunctional fused heterocyclic compounds via indene-1,3-diones. *Heteroat. Chem.* **2003**, 14, 491-497.
115. Al-Mousawi, S., John, E., Al-Kandery, N.: Studies with enaminones: Synthesis and chemical reactivity of 2-(4-dimethylamino-2-oxobut-3-enyl)-isoindole-1,3-dione and of 4-(4-dimethylamino-2-oxobut-3-enyloxy)-2*H*-phthalazin-1-one. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, 41, 381-385.
116. Anwar, H. F., Fleita, D. H., Kolshorn, H., Meier, H., Elnagdi, M. H.: 2*H*-Pyrazol-3-ylamines as precursors for the synthesis of polyfunctionally substituted pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines. *ARKIVOC* **2006**, 133-141.
117. Mustazza, C., Del Giudice, M. R., Borioni, A., Gatta, F.: Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]-, 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]- and imidazo[1,2-*a*]pyrimidines related to zaleplon, a new drug for the treatment of insomnia. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 38, 1119-1129.
118. Hassaneen, H. M. E., Hassaneen, H. M., Khiry, S. F. M., Pagni, R. M.: NMR determination of the structure of azolopyrimidines produced from reaction of bidentate electrophiles and aminoazoles. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2008**, 63, 217-222.
119. Kunick, C.: Synthese und konformative Flexibilität von 4,9-Dihydroindolo[3,2-*d*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1]benzazepinen. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1141-1143.

120. Boyd, R. B., Paull, K. D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91-109.
121. Vader, G., Lens, S. M. A.: The aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2008**, 1786, 60-72.
122. Taylor, S., Peters, J.-M.: Polo and Aurora kinases - lessons derived from chemical biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, 20, 77-84.
123. Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.-M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A., Sen, S.: Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat. Genet.* **2004**, 36, 55-62.
124. Kollareddy, M., Dzubak, P., Zheleva, D., Hajdúch, M.: Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czech. Repub.* **2008**, 152, 27-33.
125. Wang, Y., Serradell, N.: VX-680/MK-0457. *Drugs Fut.* **2007**, 32, 144-147.
126. Manfredi, M. G., Escedy, J. A., Meetze, K. A., Balani, S. K., Burenkova, O., Chen, W., Galvin, K. M., Hoar, K. M., Huck, J. J., LeRoy, P. J., Ray, E. T., Sells, T. B., Stringer, B., Stroud, S. G., Vos, T. J., Weatherhead, G. S., Wysong, D. R., Zhang, M., Bolen, J. B., Clairborne, C. F.: Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 4106-4111.
127. Strebhardt, K., Ullrich, A.: Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 321-330.
128. Martin, B. T., Strebhardt, K.: Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle* **2006**, 5, 2881-2885.
129. Lansing, T. J., McConnell, R. T., Duckett, D. R., Spehar, G. M., Knick, V. B., Hassler, D. F., Noro, N., Furuta, M., Emmitte, K. A., Gilmer, T. M., Mook Jr., R. A., Cheung, M.: In vitro biological activity of a novel small-molecule inhibitor of polo-like kinase 1. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 450-459.
130. Steegmaier, M., Hoffmann, M., Baum, A., Lénárt, P., Petronczki, M., Krssák, M., Gürtler, U., Garin-Chesa, P., Lieb, S., Quant, J., Grauert, M., Adolf, G. R., Kraut, N., Peters, J. M., Rettig, W. J.: BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr. Biol.* **2007**, 17, 316-322.
131. van Nimwegen, M. J., van de Water, B.: Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73, 597-609.
132. Tilghman, R. W., Parsons, J. T.: Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, 45-52.

-
133. Garcia-Echeverria, C., Kanazawa, T., Kawahara, E., Masuya, K., Matsuura, N., Miyake, T., Ohmori, O., Umemura, I.: Preparation of novel 2,4-di(phenyl-amino)pyrimidines useful in the treatment of neoplastic diseases, inflammatory and immune system disorders. *PCT Int. Appl.*, WO 2004080980, **2004**.
134. Liu, T.-J., LaFortune, T., Honda, T., Ohmori, O., Hatakeyama, S., Meyer, T., Jackson, D., de Groot, J., Yung, W. K.: Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 1357-1367.
135. Kath, J. C., Luzzio, M. J., Lagreca, S. D., Patel, N. C.: Preparation of salts and solvates of N-[3-[[[2-[(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-indol-5-yl)amino]-5-(trifluoromethyl)-4-pyrimidinyl]amino]methyl]-2-pyridinyl]-*N*-methylmethanesulfonamide for the treatment of abnormal cell growth. *PCT Int. Appl.*, WO 2007063384, **2007**.
136. Bagi, C. M., Roberts, G. W., Andresen, C. J.: Dual focal adhesion kinase/Pyk2 inhibitor has positive effects on bone tumors. *Cancer* **2008**, 112, 2313-2321.
137. Ingley, E.: Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1784, 56-65.
138. Finn, R. S.: Targeting Src in breast cancer. *Ann. Oncol.* **2008**, 19, 1379-1386.
139. Li, S.: Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* **2008**, 49, 19-26.
140. Li, S.: Src kinase signaling in leukaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 1483-1488.
141. Hiscox, S., Morgan, L., Green, T., Nicholson, R. I.: Src as a therapeutic target in anti-hormone/anti-growth factor-resistant breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2006**, 13, 53-59.
142. Rucci, N., Susa, M., Teti, A.: Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2008**, 8, 342-349.
143. Boschelli, D. H., Wu, B., Ye, F., Durutlic, H., Golas, J. M., Lucas, J., Boschelli, F.: Facile preparation of new 4-phenylamino-3-quinolinecarbonitrile Src kinase inhibitors via 7-fluoro intermediates: Identification of potent 7-amino analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 405-412.
144. Hennequin, L. F., Allen, J., Breed, J., Curwen, J., Fennell, M., Green, T. P., Lambert-van der Brempt, C., Morgentin, R., Norman, R. A., Olivier, A., Otterbein, L., Ple, P. A., Warin, N., Costello, G.: *N*-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-yloxy)-quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6465-6488.

145. Korff, T., Augustin, H. G.: Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J. Cell Biol.* **1998**, 143, 1341-1352.
146. Korff, T., Augustin, H. G.: Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 3249-3258.
147. Bold, G., Altmann, K. H., Frei, J., Lang, M., Manley, P. W., Traxler, P., Wietfeld, B., Bruggen, J., Buchdunger, E., Cozens, R., Ferrari, S., Furet, P., Hofmann, F., Martiny-Baron, G., Mestan, J., Rosel, J., Sills, M., Stover, D., Acemoglu, F., Boss, E., Emmenegger, R., Lasser, L., Masso, E., Roth, R., Schlachter, C., Vetterli, W., Wyss, D., Wood, J. M.: New anilinophthalazines as potent and orally well absorbed inhibitors of the VEGF receptor tyrosine kinases useful as antagonists of tumor-driven angiogenesis. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2310-2323.
148. Joensuu, H., De Braud, F., Coco, P., De Pas, T., Putzu, C., Spreafico, C., Bono, P., Bosselli, S., Jalava, T., Laurent, D., Casali, P. G.: Phase II, open-label study of PTK787/ZK222584 for the treatment of metastatic gastrointestinal stromal tumors resistant to imatinib mesylate. *Ann. Oncol.* **2008**, 19, 173-177.
149. Kunick, C., Bleeker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Link, A.: Matrix compare analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[*b*]cyclopenta[*e*]azepine-4,10(1*H*,5*H*)-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2148-2153.
150. Blackburn, C., Claiborne, C. F., Cullis, C. A., Dales, N. A., Patane, M. A., Stirling, M., Stradella, O. G., Weatherhead, G. S.: Preparation of lactam compounds useful as protein kinase inhibitors. PCT Int. Appl., WO 2006041773, **2006**.
151. Schroeder, M. C., Hamby, J. M., Connolly, C. J. C., Grohar, P. J., Winters, T., Barvian, M. R., Moore, C. W., Boushelle, S. L., Crean, S. M., Kraker, A. J., Driscoll, D. L., Vincent, P. W., Elliott, W. L., Lu, G. H., Batley, B. L., Dahring, T. K., Major, T. C., Panek, R. L., Doherty, A. M., Hollis Showalter, H. D.: Soluble 2-substituted aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl ureas. Structure-activity relationships against selected tyrosine kinases and exploration of in vitro and in vivo anticancer activity. **2001**, 44, 1915-1926.
152. Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: Purification of laboratory chemicals. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, 6-52.
153. Balasubramaniyan, V., Argade, N. P.: Reactions of cyclic anhydrides. Part XIII. Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-pyridazino[6,1-*b*]quinazoline-2,10-diones. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1988**, 27, 906-908.
154. Moriconi, E. J., Maniscalco, I. A.: π -Equivalent heterocyclic congeners of tropone. Azatropones. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 208-215.

155. Oakes, V., Pascoe, R., Rydon, H. N.: Polyazaphthalenes. Part III. Some derivatives of 1:3:5- and 1:3:8-triazaphthalene. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1045-1054.
156. Tomita, M., Minami, S., Uyeo, S.: The Schmidt reaction with benzocycloalkenones. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 183-188.
157. Wieking, K., Knockaert, M., Leost, M., Zaharevitz, D., Meijer, L., Kunick, C.: Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 7, 311-317.
158. Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.
159. Shoemaker, R. H.: The NCI 60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 813-823.
160. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
161. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., Mainz, D. T.: Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177-6196.

Danksagung

Für die Durchführung der biologischen Testungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Ehlert, Herrn Dr. M. Kubbutat, Herrn Dr. C. Schächtele, Herrn Dr. F. Totzke, Frau Dr. U. Zirrgiebel und der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, sowie bei den Mitarbeitern des National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jan Dreher, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die Durchführung der Docking-Studien sowie Herrn Dr. Lutz Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die fachliche Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom sowie Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken. Herrn Dr. U. Papke, Herrn Dr. T. Beuerle, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig, danke ich für die Erstellung der Massenspektren. Bei Herrn Prof. Dr. P. G. Jones, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig, bedanke ich mich für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analysen.

Im Übrigen danke ich den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich für die Probenvorbereitung der NMR-Experimente, die Durchführung der Elementaranalysen sowie für die Aufnahme der FT-IR-Spektren. Bei den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig möchte ich mich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten sowie deren technische Unterstützung bedanken.

Meiner wissenschaftlichen Hilfskraft Herrn H. Falke sei für seine unterstützende Tätigkeit in meinem Labor gedankt.

Den ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern meines Arbeitskreises Frau Dr. S. Kohfeld, Herrn Dr. C. Prühs, Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Herrn Dr. H. Stukenbrock, Frau Dr. C. Reichwald, Frau A. Becker, Frau W. Brandt, Frau S. Lütge, Frau N. Tolle, Frau J. Ryczak und Frau R. Determann danke ich ganz herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern für die schöne Zeit am Institut. Bei Herrn Dr. M. Lorke und den Kolleginnen der 5.Semester-Betreuung, Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Frau N. Tolle, Frau D. Kaminski, Frau S. Lucka sowie Frau M. Isedor möchte ich mich besonders für die angenehme Arbeitsgemeinschaft während der studentischen Praktika bedanken.

Sehr dankbar bin ich Frau S. Lütge und Frau R. Determann für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie für die stetige Unterstützung und Motivation.

Lebenslauf

| | |
|-----------------|---|
| Name | Anne-Marie Egert-Schmidt, geb. Egert |
| Geburtsdatum | 11. September 1978 |
| Geburtstort | Göttingen |
| 09/1991-06/1998 | Grotefend-Gymnasium Münden, Hann. Münden |
| 06/1998 | Allgemeine deutsche Hochschulreife |
| 10/1998-02/2000 | Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig |
| 04/2000-02/2004 | Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig |
| 06 - 12/2004 | Erster Abschnitt der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Rosenapotheke (Inh. Herr Dr. J. Herbort), Hann. Münden |
| 01 - 06/2005 | Zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung zur Apothekerin im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. T. Rades an der School of Pharmacy, University of Otago, Dunedin, Neuseeland |
| 10/2005 | Approbation als Apothekerin |
| seit 10/2005 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick |